

**Kinetische Untersuchungen zum System:
Mandelhydroxynitrillyase-
substituierter Benzaldehyd-Blausäure**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines Doktors
der
Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

Vorgelegt dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von
Manfred Kisslinger
aus Breslau

Marburg/Lahn 1974

Fotodruck: Erich Mauersberger, Marburg

Kinetische Untersuchungen zum System: Mandelhydroxynitrillyase- substituierter Benzaldehyd-Blausäure

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines Doktors
der
Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

Vorgelegt dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von
Manfred Kisslinger
aus Breslau

Marburg/Lahn 1974

Fotodruck: Erich Mauersberger, Marburg



Vom Fachbereich der Philipps-Universität
Marburg/Lahn als

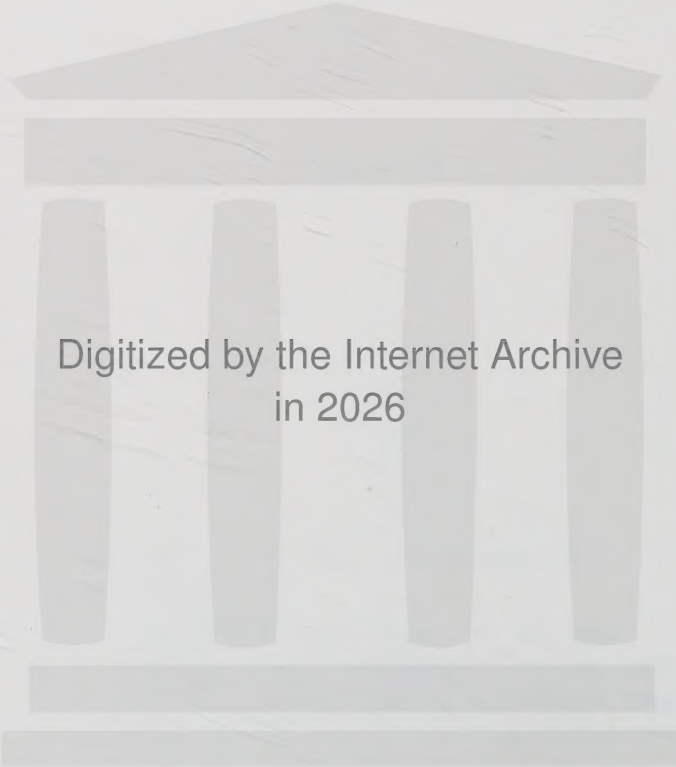
Dissertation angenommen: 2. IV. 1974

Tag der mündlichen Prüfung: 10. IV. 1974

Berichterstatter: Prof. Dr. Emanuel Pfeil

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Gotthold Ebert

Für Heidi



Digitized by the Internet Archive
in 2026

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

A. ALLGEMEINER TEIL

1 Einführung	1
2 Symmetrische Benzaldehyd-cyanhydrinreaktion	5
3 Mandel-hydroxynitrillase	11
3.1 Darstellung	11
3.2 Eigenschaften	11
3.2.1 Einfluß der Hydroxynitrillase auf die symme- trische Benzaldehydcyanhydrinreaktion	13
3.2.2 Beständigkeit der Hydroxynitrillase	15
3.2.2.1 In wässrigem Acetatpuffer	15
3.2.2.2 Gegen Substrate	15
3.2.2.3 Gegen organische und anorganische Einflußnehmer	17
3.2.3 Beeinflussung der asymmetrischen Synthese durch pH, Temperatur und Hydroxynitrillase	21
3.2.3.1 pH-Einfluß	21
3.2.3.2 Temperatureinfluß	24
3.2.3.3 Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit von der Hydroxynitrillasekonzentration	27
3.3 Ermittlung des relativen Nativitätsgrades der Hydroxynitrillase	30
3.4 Bestimmung der spezifischen Drehung des D-(+)-Benzaldehyd-cyanhydrins	32
3.5 Syntheseleistung der Hydroxynitrillase	44
4 Modifiereinfluß auf die asymmetrische Synthese	46
4.1 +Cyhy als Modifier	46
4.2 Salze, Carbonyl- und organische Verbindungen als Modifier	48

5 Kernsubstituenteneinfluß auf das katalytische Potential der Hdroxynitrillyase	53
5.1 Sterische Effekte	55
5.2 Mesomere und induktive Effekte	58
6 Kinetik der Hydroxynitrillyase	69
6.1 Enzymatische D-(+)-Benzaldehydcyanhydrin-Spaltung	70
6.2 Enzymatische D-(+)-Benzaldehydcyanhydrin-Synthese	72
6.2.1 Beeinflussung der Sättigungsgeschwindigkeit; Aktivität der hydroxynitrillyase bei infiniten Konzentrationen des variablen Substrates	77
6.2.2 Beeinflussung der Kombinationsgeschwindigkeit; Veränderung der Enzymaktivität durch Kombination einer Enzymspezies mit variablem und fixem Substrat	81
7 Überlegungen zum enzymatischen Reaktionsablauf	87
8 Zusammenfassung	93

B EXPERIMENTELLER TEIL

1 Darstellung von Mandel-hydroxynitrillyase	94
2 Darstellung und Reinigung der Substrate	95
2.1 Blausäure	95
2.2 Benzaldehyde	96
2.3 D-Benzaldehydcyanhydrine	97
3 Bereitung der Lösungsmittel	99
3.1 O ₂ -freies Wasser und O ₂ -freier Alkohol	99
3.2 Puffer	99
4 Durchführung kinetischer Messungen	101
4.1 Standardmessungen	101
4.2 Substratvariation	102
5 Mathematische Auswertungen	102
5.1 Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeit	103
5.2 Spezifische Drehung substituierter D-Benzaldehydcyanhydrine	103
5.3 Fehler, Varianz und Korrelation	105
Literaturverzeichnis	107
Abkürzungsverzeichnis	110

A ALLGEMEINER TEIL

1 Einführung

Hydroxynitrillase (E.C.: 4.1.2.10) ist ein Enzym, das in den Prunoideen und Maloideen vorkommt und mit β -Glucosidase den bereits von Rosenthaler¹⁾ und Nordefeld²⁾ als Emulsin beschriebenen Komplex bildet. In den dreißiger Jahren veröffentlichten Albers und Mitarbeiter³⁾ zahlreiche Arbeiten über das Ferment Oxynitrilase. Die Reindarstellung der Mandel-Hydroxynitrillase (OxL) gelang erstmals Becker⁴⁾ aus Preßrückständen der Mandelölgewinnung. Die Aldehydlyase OxL hat die nicht nur für die präparative organische Chemie nützliche Eigenschaft, mit Blausäure und einer Reihe von aliphatischen und aromatischen Aldehyden^{4,5)} optisch aktive Cyanhydrine zu synthetisieren. Umfangreiche kinetische Daten über die OxL fehlen bisher in der Literatur, wenn auch Seely⁶⁾, Becker⁴⁾ und andere Autoren einige Werte angeben.

In dieser Arbeit wird versucht, mit kinetischen Methoden die durch OxL katalysierten R-Benzaldehyd-cyanhydrinreaktionen (R = Substituent am Phenylkern) qualitativ und quantitativ zu erfassen. Wegen der Eigenschaft der OxL, die Bildung der D-Epimeren der Cyanhydrine zu beschleunigen, ist für Geschwindigkeitsberechnungen die Messung des Drehwinkels der der Extinktion vorgezogen worden. Aus den erhaltenen Ergebnissen sollen Rückschlüsse auf den Reaktionsmechanismus gezogen werden. Außerdem können sie Hinweise auf das aktive Zentrum der OxL und auf präparative Methoden zur Herstellung von optisch aktiven Benzaldehyd-cyanhydrinen (D-Cyhy'en) liefern.

Die Umsetzung des Benzaldehyds (BA's) und substituierter Benzaldehyde (R-BA'e) mit HCN und OxL zu D-Cyhy'en wirft eine Reihe von Problemen auf, die bei in vivo

Reaktionen von untergeordneter Bedeutung sein dürften. Die Verwendung alkoholischer Lösungsmittel ist wegen der geringen Löslichkeit der R-BA'e in rein wässrigen Lösungsmitteln notwendig. Aus apparativen Gründen müssen noch dazu Substratkonzentrationen eingesetzt werden, die wesentlich über denen liegen, die allgemein in der enzymologischen Literatur genannt werden. Hinzu kommt, daß Aldehyde mit freien Aminogruppen des Enzyms zu Azomethinen reagieren können. Zusätzlich bilden einige R-BA'e chinoide Strukturen. Dadurch können sich die Substrate einer enzymatischen Umsetzung entziehen. Möglich wäre auch die Bildung von charge transfer Verbindungen zwischen der prosthetischen Gruppe bzw. aromatischen Aminosäureresten und chinoiden Strukturen der R-BA'e. Auf diese Weise könnte die enzymatische Umsetzung verhindert werden. Außerdem wird das zweite Substrat, HCN, in der Enzymologie als Inhibitor beschrieben. Schließlich läuft die symmetrische Synthese synchron zur asymmetrischen ab. Die Racemisierung der Produkte darf ebenfalls nicht vernachlässigt werden. Alle diese Faktoren können eine kinetische Untersuchung des Systems: R-BA/HCN/OxL in Frage stellen; für den Reaktionsbeginn weniger, stärker für präparative Zwecke oder für theoretische Herleitungen aus den zu erhaltenen Daten.

Die Grundlage kinetischer Untersuchungen ist die Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeit. Allgemein ist sie definiert als Konzentrationsänderung (Δc) pro Zeiteinheit (Δt). Verfolgt man die asymmetrische Benzaldehyd-cyanhydrinsynthese (+Cyhy-Synthese) an Hand der Produktzunahme, gilt:

$$v = + \frac{\Delta c}{\Delta t} \quad (1)$$

Außerdem ist für Reaktionen zweiter Ordnung die Geschwindigkeit wie folgt definiert:

$$v = k \cdot a \cdot b \quad (2)$$

k ist die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion $A + B \rightarrow C$,

a und b sind die Konzentrationen der Reaktanten A und B. Die allgemeine Geschwindigkeitsgleichung einer Bisubstratreaktion lautet:

$$v_o = \frac{V \cdot a_o \cdot b_o}{K_A \cdot K_{MB} + K_{MA} \cdot b_o + K_{MB} \cdot a_o + a_o \cdot b_o} \quad (3)$$

$$v_o = k' \cdot \frac{e_o}{K_A \cdot K_{MB} + K_{MA} \cdot b_o + K_{MB} \cdot a_o + a_o \cdot b_o} \cdot a_o \cdot b_o \quad (4)$$

Umformen von (3) zu (4) zeigt, daß die Berechnung der Anfangsgeschwindigkeit nur im Ausnahmefall nach einer Reaktion 2. Ordnung erfolgen kann. Für die v_o -Bestimmung eignet sich die Differenzenmethode (Gleichung (1)) am besten.

Nach Gleichung (4) ist v_o proportional e_o . Aus diesem Grunde kann eine neue Konstante, die molekulare Aktivität (a_m), eingeführt werden:

$$v_o = a_m \cdot e_o \quad (5)$$

v_o wird in dieser Arbeit in mol/l·min angegeben und nicht in kat (v in mol/l·min = 60· v in kat). a_m ist mit der katalytischen Konstante identisch. a_m ist eingeführt worden, da die katalytische Konstante der Enzymologie unter Substratsättigung bestimmt wird. Kinetische Messungen im Sättigungsbereich der OxL mit den Substraten sind aber nicht möglich. Neben a_m wird die spezifische Aktivität (a_s) als Maß für das katalytische Potential eines Enzyms benutzt:

$$a_s = \mu\text{mole gebild. Produkt pro min pro mg Enzym} \quad (5a)$$

a_s bezieht sich auf den Reaktionsbeginn. Als weiteres Kriterium für das katalytische Potential der OxL in bezug auf die Syntheseleistung wird der Ausdruck Unit (u_{sl}) benutzt:

$$u_{sl} = \text{mole gebild. Produkt pro min} \quad (5b)$$

u_{sl} bezieht sich auf das Reaktionsende.

Die Bedingungen, unter denen die Aktivitäten dieser Arbeit erhalten werden, lauten (vgl. exp. Teil, Kap.3):
§) 50 %iger äthanol., 0,05 n Essigsäure-Acetatpuffer vom

pH = 5,4;

B) Reaktionstemperatur = 20 ° Celsius;

&) 0,1 ml BA (a_0 ca. 0,1 mol/l), 0,3 ml HCN (b_0 ca. 0,75 mol/l) und 0,1 mg OxL (d_0 ca. $1,35 \cdot 10^{-7}$ mol/l) in 10,3 ml Reaktionslösung.

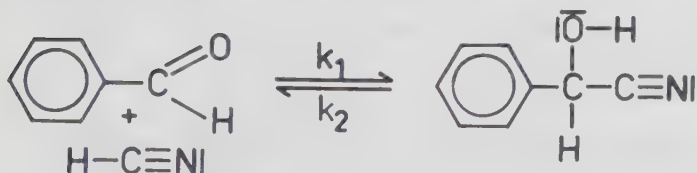
Unter diesen Standardbedingungen sind Reaktionen gefahren worden, um quantitative Aussagen über die oben erwähnten einflußnehmenden Faktoren machen zu können. Die aus diesen Messungen erhaltenen Ergebnisse geben Auskunft, ob das für diese Arbeit gewählte Enzym-Substrat-System quantitativ untersucht werden darf oder nicht.

Katalysatoren üben nur einen Einfluß auf die Geschwindigkeit der Gleichgewichtseinstellung aus. Deshalb wird zunächst auf die symmetrische Benzaldehyd-cyanhydrinreaktion (Cyhy-Reaktion) eingegangen. Außerdem kann festgestellt werden, ob die durch OxL beschleunigte Bildung des D-Epimeren des Cyhy's prinzipielle Unterschiede zum symmetrischen Reaktionsablauf aufweist.

2 Symmetrische Benzaldehyd-cyanhydrinreaktion

In der Literatur wird die Cyhy-Reaktion folgendermaßen beschrieben. Ultée, Wirth und Kiliani⁷⁾ beobachteten die beschleunigende Wirkung basischer Stoffe. Lapworth⁸⁾ postulierte eine langsame $\text{CN}^\ominus$ -Anlagerung an die Carbonylgruppe und eine schnelle $\text{H}^\oplus$ -Anlagerung an das entstandene Ion. Albers³⁾ bewies, daß in 50 %igem Äthanol, 0,5 n Acetatpuffer (pH=5,3) bei 20 °C die Cyhy-Synthese eine Reaktion zweiter Ordnung ist und daß sie bimolekular verläuft, wobei sich Aldehydmoleküle und Cyanidionen vereinigen. Nach ihm wird die $\text{CN}^\ominus$ -Konzentration und damit die Reaktionsgeschwindigkeit durch die $\text{OH}^\ominus$ -Konzentration bestimmt. Weiterhin zeigte er, daß die $\text{H}^\oplus$ -Konzentration keinen Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit hat. Bei der Acetoncyanhydrinsynthese ist eine $\text{H}^\oplus$ -Gegenwart erforderlich, da diese Reaktion nach Swirbely⁹⁾ und Hustedt¹⁰⁾ bei Abwesenheit protonenaktiver Lösungsmittel und Blausäure nicht abläuft.

Die Gesamtreaktion gibt Gleichung (6) wieder. In ihr ist k_1 die Geschwindigkeitskonstante der Cyhy-Synthese, k_2 die für die Cyhy-Spaltung in BA und HCN. Albers³⁾ gibt

$$\text{BA} + \text{HCN} \rightleftharpoons \text{Cyhy} \quad (6)$$


für alkoholischen Acetatpuffer ein k_1 von $2 \cdot 10^{-2}$ (1/mol·min) an. Lapworth⁸⁾ und Baker¹¹⁾ bestimmten die Gleichgewichtskonstante K_{GL} in 95 %igem Äthanol zu $4,72 \cdot 10^3$ bzw. zu $4,47 \cdot 10^3$ (1/mol). Beide nannten für die freie Reaktionsenthalpie einen Wert von $-3,1 \cdot 10^3$ (cal/mol).

Um für die von mir verwendeten Reaktionsbedingungen

Vergleichs- und Deutungsmöglichkeiten zu haben, wurde die Cyhy-Reaktion bei 12, 16, 20 und 24 °C untersucht. Abb. 1 gibt eine graphische Übersicht der erhaltenen Daten. Sie weichen erheblich von den oben angeführten Werten ab und sind im einzelnen in der Legende zu Abb. 1 wiedergegeben. Der Grund dafür dürften die unterschiedlichen Reaktionsbedingungen sein. Schoof¹²⁾ zeigt, daß K_{GL} der Cyhy-Reaktion mit zunehmender Alkoholkonzentration des Lösungsmittels rapide ansteigt, was im Einklang mit den Literaturwerten und meinen eigenen steht. Da Alkohol ein besseres Lösungsmittel als wässriger Puffer für BA und Cyhy ist, wird die Solvatation größer und die Bewegungsfreiheit der gelösten Moleküle geringer. Aus diesem Grunde steigen der ΔS^0 - und ΔG^0 -Betrag und damit die Gleichgewichtskonstante.

Für die Bestimmung der Zahlenwerte der kinetischen und thermodynamischen Größen sind die angeführten Gleichungen benutzt worden. Für eine Reaktion 2. Ordnung und für unterschiedliche Eduktkonzentrationen gilt:

$$y_{ab} = \frac{1}{a-b} \cdot \ln \frac{b(a-c)}{a(b-c)} = k \cdot t \quad (7)$$

a, b = Anfangskonzentration der Edukte (Bedingung: $a > b$); c = Produktkonzentration zur Zeit t ; k = Geschwindigkeitskonstante in $l/mol \cdot min$.

Trägt man y_{ab} gegen t auf, liefert, wenn a und b die Konzentrationen des BA's und der HCN sind und c die Konzentration des Cyhy's ist, die Geradensteigung den k_1 -Wert. Für eine Reaktion 1. Ordnung gilt:

$$\ln c = -k \cdot t + \ln c_0 \quad (8)$$

c_0 = Eduktkonzentration zur Zeit $t=0$, c die zur Zeit t ; k = Geschwindigkeitskonstante in $1/min$.

Trägt man $\ln c$ gegen t auf und ist c die Cyhy-Konzentration zum Zeitpunkt t , entspricht k_2 dem negativen Steigungswert. Für K_{GL} und die Dissoziationskonstante des Cyhy's (K_{diss}) gilt:

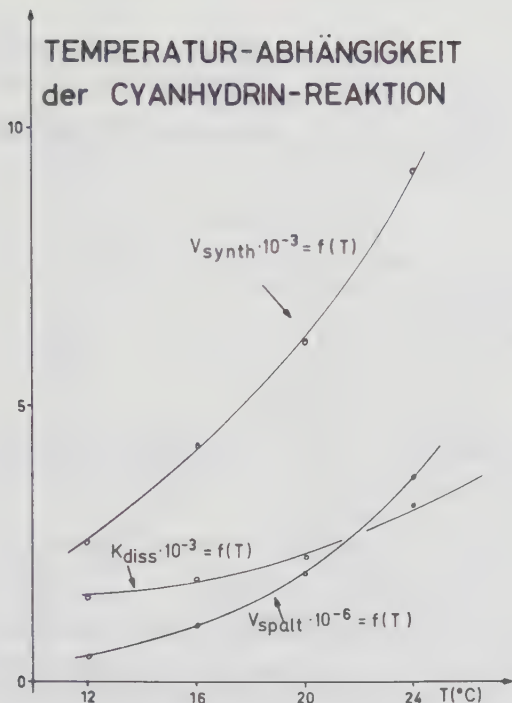
$$K_{GL} = k_1/k_2 = 1/K_{diss} \quad (l/mol) \quad (9)$$

Für die freie Reaktionsenthalpie (ΔG^0) gilt:

$$\Delta G^0 = -R \cdot T \cdot \ln K_{GL} \quad (10)$$

Die Gleichung für die Berechnung der Reaktionsenthalpie

Abb. 1



Cyhy-Reaktion: in 50 %igem äthanolischen

Acetatpuffer vom $\text{pH} = 5,4$;

v_{synth} = Geschwindigkeit der symmetrischen Synthese;
normiert auf 0,8 mol HCN und 0,1 mol BA;
entspricht den Standardmessungen der enzy-
matischen Reaktion (Kap. 1);

v_{spalt} = Geschwindigkeit der +Cyhy-Spaltung in BA
und HCN; normiert auf 0,01 mol +Cyhy;
für 20 $^{\circ}\text{C}$ gelten:

$k_1 = 7,79 \cdot 10^{-2}$ (1/mol·min); $k_2 = 1,99 \cdot 10^{-4}$ (1/min);
 $K_{\text{GL}} = 3,94 \cdot 10^{+2}$ (1/mol); $K_{\text{diss}} = 2,54 \cdot 10^{-3}$ (mol/l).

(ΔH°) lautet:

$$\frac{d(\ln K_{\text{GL}})}{dT} = - \frac{\Delta H^{\circ}}{RT^2} \quad (11)$$

Trägt man $\ln K_{\text{GL}}$ gegen $1/T$ auf, erhält man aus der Geraden-
steigung den Enthalpiewert. Die Entropie der Reaktion (ΔS°)

läßt sich nach (12) berechnen:

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad (12)$$

Für die freie Aktivierungsenthalpie gilt:

$$\Delta G^\ddagger = - R \cdot T \cdot \ln K^\ddagger \quad (13)$$

wobei $K^\ddagger$ die Gleichgewichtskonstante für das System:

Edukte/aktivierter Übergangszustand ist. Hierfür gilt:

$$K^\ddagger = \frac{k \cdot h}{k_B \cdot T} \quad (13a)$$

k = Geschwindigkeitskonstante bei der Temperatur T ; h = Plank'sches Wirkungsquantum; k_B = Boltzmannkonstante

Die Aktivierungsenthalpie wird nach (14) berechnet:

$$\frac{d(\ln k)}{dT} = \frac{\Delta H^\ddagger + R \cdot T}{R \cdot T^2} \quad (14)$$

Die Steigung eines $\ln k - 1/T$ - Diagramms liefert die Aktivierungsenthalpie. Für die Aktivierungsenergie gilt:

$$E_{\text{akt}} = \Delta H^\ddagger + R \cdot T \quad (14a)$$

Die Berechnung der Aktivierungsentropie erfolgt nach:

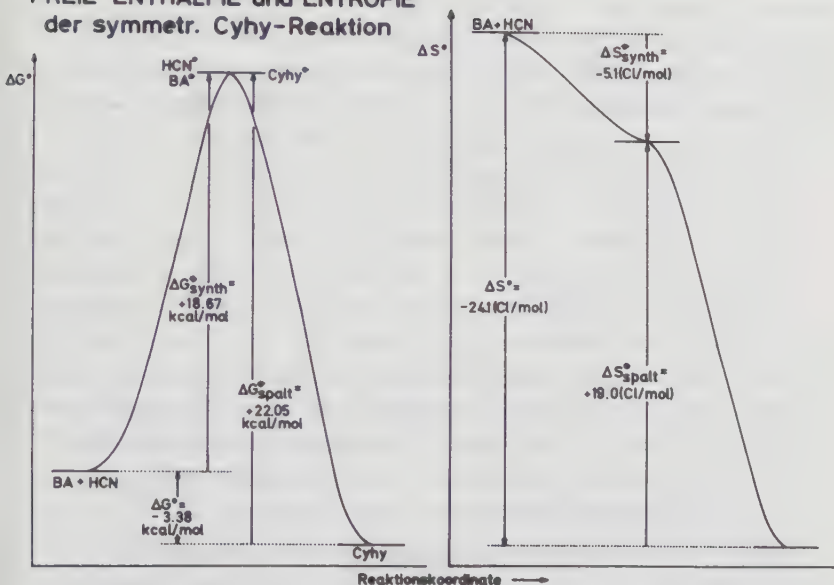
$$\Delta S^\ddagger = (\Delta H^\ddagger - \Delta G^\ddagger)/T \quad (15)$$

Die erhaltenen Zahlenwerte der thermodynamischen Zustandsgrößen sind in Abb. 2 und ihrer Legende angeführt. Der negative ΔG° - und der geringere $\Delta G^\ddagger$ -Wert der Cyhy-Synthese gegenüber der Cyhy-Spaltung zeigen, daß die Reaktion in Richtung der Cyhy-Bildung spontan verläuft. Aufgrund der präparativen Erwartung war dies zu erwarten.

Aus der Abnahme der Entropie ($\Delta S^\circ < 0$) ist zu schließen, daß im verwendeten Lösungsmittel bei der Produktbildung der Ordnungsgrad zunimmt. Nach Reaktionsschema (6) war dies ebenfalls anzunehmen. Der experimentell bestimmte Wert der Aktivierungsentropie eignet sich nach Barrow und Moore¹³⁾ am besten für eine Auskunft über die Natur des aktivierten Übergangszustandes. Betrachtet man die Cyhy-Spaltung, ist aus dem positiven $\Delta S^\ddagger_{\text{spalt}}$ -Wert zu schließen, daß im aktivierten Übergangskomplex lockerere Bindungen als im Cyhy selbst bestehen. Außerdem besitzt dieser Komplex mehr Bewegungsfreiheit als Cyhy. Er ist geringer solvatisiert als Cyhy. Da $\Delta S^\circ \simeq \Delta S^\ddagger_{\text{spalt}}$ ist, besitzt der

Abb. 2

FREIE ENTHALPIE und ENTROPIE der symmetr. Cyhy-Reaktion



Cyhy-Reaktion: thermodynamische Daten; Reaktionen in 50 % äthanol., 0,05 n Acetatpuffer; Cl = Clausius = cal/grd;

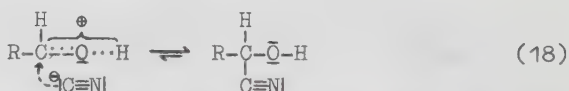
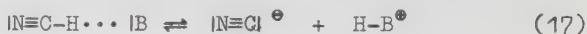
Indices: o, * für Zustandsfunktionen der Reaktion bzw. der Aktivierung; spalt = Cyhy-Spaltung in BA und HCN; synth = Cyhy-Synthese;

$E_{\text{akt}}^{\text{synth}} = 17,8 \text{ kcal/mol}$; $E_{\text{akt}}^{\text{spalt}} = 28,3 \text{ kcal/mol}$;

$H_{293}^{\circ} = -10,55 \text{ kcal/mol}$

Übergangskomplex eine dem Produkt (HCN, BA) ähnliche Struktur. Danach lockert sich die Bindung zwischen dem asymmetrischen C-Atom und dem Cyanidkohlenstoff. Von Seiten der Cyhy-Synthese ist wegen des negativen $\Delta S_{\text{synth}}^{\circ}$ Wertes zu folgern, daß Translations- und Rotationsfreiheitsgrade bei der Assoziation beider Moleküle verloren gehen. Der geringe Betrag der Aktivierungsentropie fordert für den aktivierten Übergangskomplex eine den Edukten ähnliche Struktur. Der negative Wert läßt den Schluß zu, daß der aktivierte Komplex ionisch ist, weniger Bewegungs-

freiheit hat und stärker solvatisiert ist als BA und HCN, die nicht aktivierten Edukte. Aus diesem Grunde sind im ersten Schritt eine Aufhebung der C=O-Bindung durch Elektronenentzug und eine Deprotonierung der HCN gegeben. Die Gleichungen (16) bis (18) verdeutlichen den Reaktionsablauf. Langsamster Schritt ist aufgrund der thermodynami-



schen Daten die Anlagerung bzw. die Abspaltung des Cyanidions. Würde die Reaktion nach Lapworth⁸⁾ oder Albers³⁾ ablaufen, müßte der aktivierte Übergangskomplex eine dem Produkt (Cyhy) ähnliche Struktur haben und der $\Delta S^{\ddagger}_{\text{synth}}$ -Betrag der Reaktionsentropie in etwa gleichen.

Baker¹¹⁾ führte die Cyhy-Synthese in Gegenwart von Benzoesäure ($\text{pK}=4,2^{14)$, $\text{pK}_{\text{HCN}}=9,3^{15)$) und Pyridin durch. Der in katalytischen Mengen zugefügte Puffer kann das Proton für die Lockerung der C=O-Bindung liefern und HCN deprotonieren. Es ist daher anzunehmen, daß auch in 95 % Äthanol die Cyhy-Synthese nach den Gleichungen (16) bis (18) abläuft. Die Ergebnisse von Hustedt¹⁰⁾ zeigen, daß generell bei Cyanhydrinsynthesen aus aliphatischen und aromatischen Aldehyden die Anwesenheit protonenaktiver Lösungsmittel oder die von Kationen notwendig ist. Er untersuchte auch die +Cyhy-Synthese mit Cinchonin als Katalysator. Für diese Reaktion ist primär die Aktivierung der Carbonylgruppe notwendig. Entsprechendes formulierte Prelog¹⁶⁾, der Zimtaldehyd mit Chinalakaloiden zum optisch aktiven Produkt umsetzte. Die beschriebenen und erhaltenen Ergebnisse lassen vermuten, daß auch die durch OxL katalysierten D-Cyhy-Synthesen dementsprechend ablaufen.

3 Mandel-hydroxynitrillyase

3.1 Darstellung

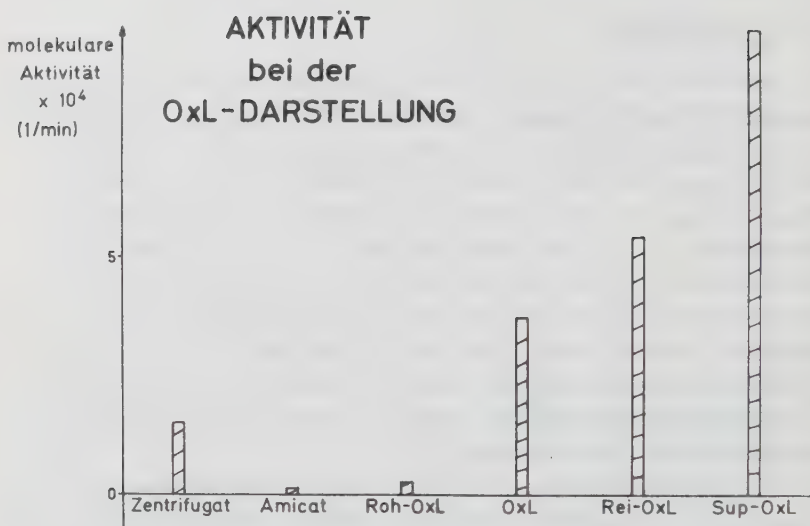
Die Reindarstellung der OxL erfolgte nach dem von Mehner¹⁷⁾ modifizierten Becker'schen Verfahren⁴⁾. Aus Bittermandelkleie wird mit wässrigem Ammoniak extrahiert, der Extrakt mit verdünnter Essigsäure angesäuert, zentrifugiert und in einer Ultrafiltrationszelle das Zentrifugat eingengt. Auf diese Weise erhält man in zwei Tagen eine ankonzentrierte Lösung (Amicat), die neben OxL hochmolekulare Proteine, u. a. Phosphatase und β -Glucosidase¹⁸⁾, enthält. Anschließend wird das Amicat über Sephadex gefiltriert. Aus erneuter Fraktionierung resultieren Reinheitsstufen, die in Abb. 3 mit Roh-OxL, OxL, Rei-OxL und Sup-OxL bezeichnet werden.

Der Aktivitätsabfall vom Zentrifugat zum Amicat zeigt deutlich, wie drastisch die Bedingungen sind, bei denen die OxL eingengt wird. Die Ausgangsaktivität fällt nach der Ultrafiltration auf ca. 13 v.H.. Die nach dem Amicat eintretende Aktivitätssteigerung nach jeder Gelfiltration ist auf einen zunehmenden Reinheitsgrad zurückzuführen.

Der große Zeitgewinn rechtfertigt die OxL-Darstellung über die Einengung in einer Ultrafiltrationszelle. Legt man das von Aschoff¹⁹⁾ modifizierte Becker'sche Verfahren zugrunde und chromatographiert das Emulsin ohne es vorher zu trocknen, werden die Möglichkeiten einer Denaturierung des Proteinteils der OxL auf ein Minimum beschränkt, was andererseits mit einem größeren apparativen Aufwand und einem Zeitverlust gegenüber dem beschriebenen Verfahren erkauft wird.

3.2 Eigenschaften

OxL ist ein gelbes Chromoprotein mit FAD als prosthetische Gruppe⁴⁾. Das Apoenzym enthält Galaktose als Zuckerkomponente²⁰⁾. Pfeil und Mitarbeiter^{4,18,19,21)}



OxL-Aktivität: Reinheitsstufen bei der OxL-Darstellung; nach der Standardmethode wurde die Aktivität bestimmt; d_o ist über den molaren Extinktionskoeffizienten bei 460 nm bestimmt worden;

<u>Aktivität</u>	a_m	a_r	a_s
Zentrifugat:	9.200 1/min	9,2%	13.300
Amicat:	1.200 1/min	1,2%	1.700
Roh-OxL:	2.200 1/min	2,2%	3.200
OxL:	39.700 1/min	39,7%	58.400
Rei-OxL:	52.100 1/min	52,2%	76.700
Sup-OxL:	99.900 1/min	100,0%	146.900

Reinheitsstufe Sup-OxL ist nicht mit viermal gereinigtem Enzym erhalten worden (vgl. exp. Teil, Kap. 1)
 a_m = molekulare Aktivität in 1/min (katal. Konst.)
 a_r = relative Aktivität in % bezogen auf Sup-OxL
 a_s = spezifische Aktivität in mol gebild. Produkt pro min pro mg OxL

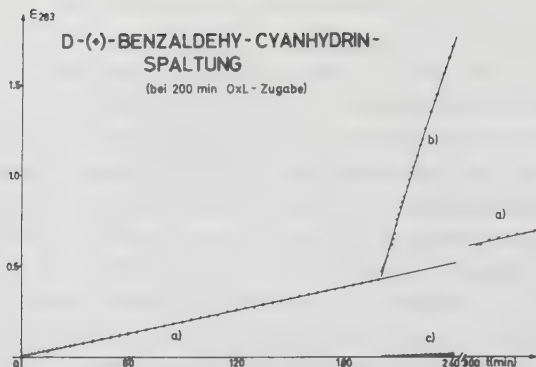
konnten erstmals FAD reversibel vom Apoenzym trennen. Ihre Untersuchungen über die Absorptionseigenschaften der OxL zeigen, daß FAD in einem stark hydrophoben Bereich des Apoproteins gebunden ist. Der Isoalloxazinring des FAD's hat die Eigenschaft zu fluoreszieren. Seine Fluoreszenz nimmt in den folgenden Verbindungen in der Reihenfolge: Riboflavin, FAD, OxL, OxL·BA ab. BA löscht die Fluoreszenz

von FAD und OxL ganz. Fügt man diesen beiden Systemen HCN zu, tritt erneut Fluoreszenz auf. Das FAD der OxL agiert nicht als Redoxpartner. Es hat einen entscheidenden Einfluß auf die Kettenkonformation des Proteinteils der OxL. Während das reine Apoenzym eine langgestreckte ellipsoide Form hat, liegt es im Holoenzym in kugelförmiger Gestalt vor. FAD wirkt außerdem stabilisierend auf das Proteid. Natives Apoenzym denaturiert nur unter speziellen Bedingungen sehr langsam, während es im Holoenzym selbst in alkoholischem Acetatpuffer über den Zeitraum kinetischer Messungen stabil bleibt. Diese und weitere in der Literatur angeführten Eigenschaften wurden am natürlichen Gemisch der drei Isoenzyme der OxL festgestellt. In meiner Arbeit beziehen sich sämtliche Angaben auf das natürliche Gemisch der Mandel-hydroxynitrillyase. Für die d_o -Berechnung wurde das von Aschoff¹⁹⁾ angegebene mittlere Molekulargewicht von 66.150 zugrunde gelegt.

3.2.1 Einfluß der Hydroxynitrillyase auf die symmetrische Benzaldehyd-cyanhydrinreaktion

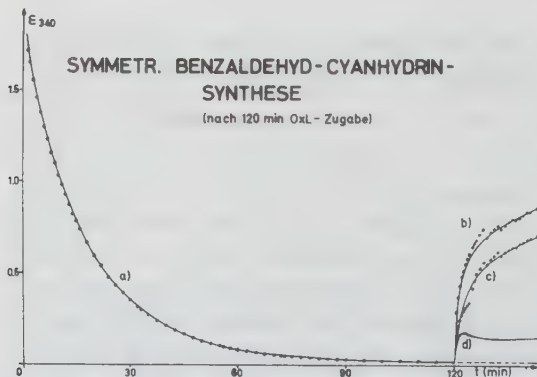
Welchen Einfluß OxL auf die Cyhy-Reaktion ausübt, zeigen Abb. 4 und 5. Die Spaltung des +Cyhy's kann anhand der Extinktionsabnahme bei 283 nm im UV am besten verfolgt werden, da bei dieser Wellenlänge das Cyhy nicht absorbiert und die Carbonylbande des BA's eine starke Absorption aufweist. Der fast rechtwinkelige Anstieg der Extinktion in Abb. 4, Kurve b) verdeutlicht die katalytische Beeinflussung der Spaltungsreaktion durch OxL. Der nach 72 h gemessene ϵ_{340} -Wert von 0,097 verweist auf einen BA-Gehalt von 5,67 mg in Lösung a). Dies kann aber aufgrund der Gleichgewichtslage nicht möglich sein. Die Ursache dafür ist die Hydrolyse der HCN zu Ammoniak und Ameisensäure. Für die v_o -Bestimmung darf die kinetisch benachteiligte Folgereaktion vernachlässigt werden. Die Cyhy-Synthese ist unter den angeführten Bedingungen nach zwei Stunden beendet. Die Kurven b), c) und d) der Abb. 5

Abb. 4



+Cyhy-Spaltung: Reaktion mit und ohne OxL;
a) 9,05 mg +Cyhy in 10 ml wässrig alkoholischem Acetatpuffer; b) 3 ml der Lösung a) nach 200 min mit 0,023 mg OxL versetzt; c) 3 ml Lösungsmittel mit 0,023 mg OxL versetzt;

Abb. 5



Cyhy-Synthese: nach erfolgter Cyhy-Bildung wird der OxL-Einfluß auf die im Gleichgewicht vorhandenen Substrate gezeigt; a) 0,1 ml BA und 0,3 ml HCN in 10 ml wässrig alkoholischem Puffer; b) 3 ml Lösung a) mit 2,3 mg OxL versetzt; c) 3 ml Lösungsmittel mit 2,3 mg OxL versetzt; d) Extinktion der Lösung b) minus Extinktion der Lösung c).

lassen eine klare Aussage über den OxL-Einfluß nicht zu, da d_0 zu hoch liegt und das Apoenzym ausfällt.

3.2.2 Beständigkeit der Hydroxynitrillase

3.2.2.1 In wässrigem Acetatpuffer

Reine OxL wird mit Ammoniumsulfat gefällt. Den Niederschlag bewahrt man im Kühlschrank auf. Für kinetische Messungen wird die ausgesalzene OxL an Sephadex mit wässrigem Acetatpuffer entsalzt. Um tägliches Entsalzen zu umgehen, wurde geprüft, ob die OxL in wässrigem Acetatpuffer bei 0 °C bis 4 °C längere Zeit stabil bleibt. Führt man Standardmessungen einer Enzymprobe und trägt die berechneten $v_{0,i}$'s gegen die Zeitspannen vom Entsalzen des Enzyms bis zum Beginn der einzelnen Standardmessungen t_i auf, sollte bei einem Einfluß des Puffers auf die OxL-Stabilität v_0 mit zunehmender Verweilzeit im Puffer abnehmen. Gleichung (19) gibt das Resultat als lineare Funktion wieder:

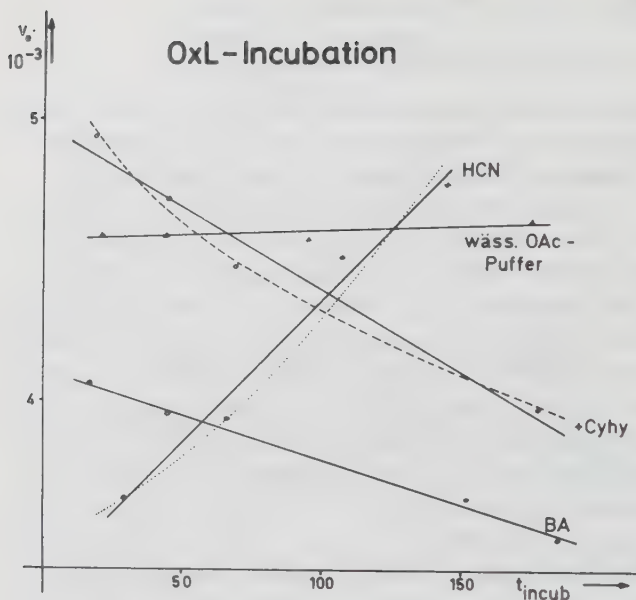
$$v_{0,i} = -5,14 \cdot 10^{-7} \cdot t_i + 8,89 \cdot 10^{-3} \quad (19)$$

Varianz und Korrelation dieser Regressionsgeraden ($s_{yx}^2 = 1,3 \cdot 10^{-7}$; $r = 0,389$; $f = 21$) sagen aus, daß mit 10 % Irrtumswahrscheinlichkeit ein Zusammenhang zwischen t_i und $v_{0,i}$ signifikant ist. Bei geringerer Irrtumswahrscheinlichkeit lassen die Student'schen t-Werte auch bei beliebiger Wiederholung der Messungen keine Signifikanz erwarten. Transformiert man diese Aussage ins enzymatische Problem, gilt: die OxL bleibt unter diesen Bedingungen längere Zeit stabil. Arbeitet man mit 10 % Irrtumswahrscheinlichkeit, nimmt nach Gleichung (19) die native Enzymmenge in 50 Tagen um 6,9 % ab. Die Halbwertszeit der OxL-Denaturierung beträgt unter diesen Bedingungen und nach zwanzig Regressionskoeffizienten:

$$t_{1/2} = 185 \text{ Tage} \quad (20)$$

3.2.2.2 Gegen Substrate

Incubiert man OxL in wässrigem Acetatpuffer mit BA und fährt mit diesen Enzymproben Standardmessungen, erhält man über Aktivitätsbestimmungen die OxL-Stabilität gegen



OxL-Stabilität: OxL mit den Substraten incubiert, in Zeitabständen mit diesen Enzymproben Standardmessungen gefahren und v_o gegen die Incubationszeit aufgetragen;

Konzentrationswerte der Einflußnehmer in mol/l:
HCN = $1,25 \cdot 10^{-3}$; BA = $9,56 \cdot 10^{-4}$; +Cyhy = $3,51 \cdot 10^{-4}$;

Konzentrationswerte der Standardmessungen in mol/l:

Einflußnehmer	OxL	HCN	BA
Puffer, HCN, BA	$4,88 \cdot 10^{-8}$	0,751	0,0956
+Cyhy	$1,19 \cdot 10^{-7}$	0,103	0,0981

Geschwindigkeiten und prozentuale Veränderungen:

Einflußnehmer	v_{to}	v_1	v_n	$\% \frac{v_1}{v_n}$	$\% \frac{v_1}{v_n}$	$\% \frac{v_1}{v_n}$
wässr. Puffer	4,88	4,58	4,64	-	-	-
BA	4,88	4,06	3,50	-28	-17	-14
HCN	4,88	3,66	4,76	-	-25	+30
+Cyhy	5,34	4,95	3,98	-25	-	-20

v-Werte in 10^{-3} mol/l·min; v-Indices: v_{to} = v zum Zeitpunkt $t_{\text{incub}} = 0$; 1 = erste, n = letzte bestimmte Geschwindigkeit; $\% \frac{v_1}{v_n}$: Abweichung der v_n von v_o in %; nur angeführt, wenn Betrag größer 10.

BA (Abb. 6). Unter identischen Reaktionsbedingungen ist die molekulare Aktivität gleich. Da v_o abnimmt, kann nur die katalytisch wirksame OxL-Menge geringer werden. Die

Die nach Gleichung (5) aus v_o berechnete Konzentrationsabnahme der OxL innerhalb der ersten drei Stunden beträgt ca. $6 \cdot 10^{-9}$ mol/l, $t_{1/2}$ der OxL-Denaturierung 628 min. Die BA-Konzentration für die Incubation ist ca. 10^4 mal größer als d_o und ca. 10^2 mal geringer als a_o der Standardmessung. Dieses geringe a_o schließt eine Beeinflussung der Geschwindigkeit durch Erhöhung des a_o 's der Standardmessung aus. Die Drehwertänderungen sind bei der +Cyhy-Reaktion nur während der ersten sechs Minuten verfolgt worden. Daraus resultiert ein mittlerer prozentualer Fehler von 0,5 %. Die denaturierende Wirkung des BA's auf OxL kann deshalb bei der v_o -Bestimmung vernachlässigt werden.

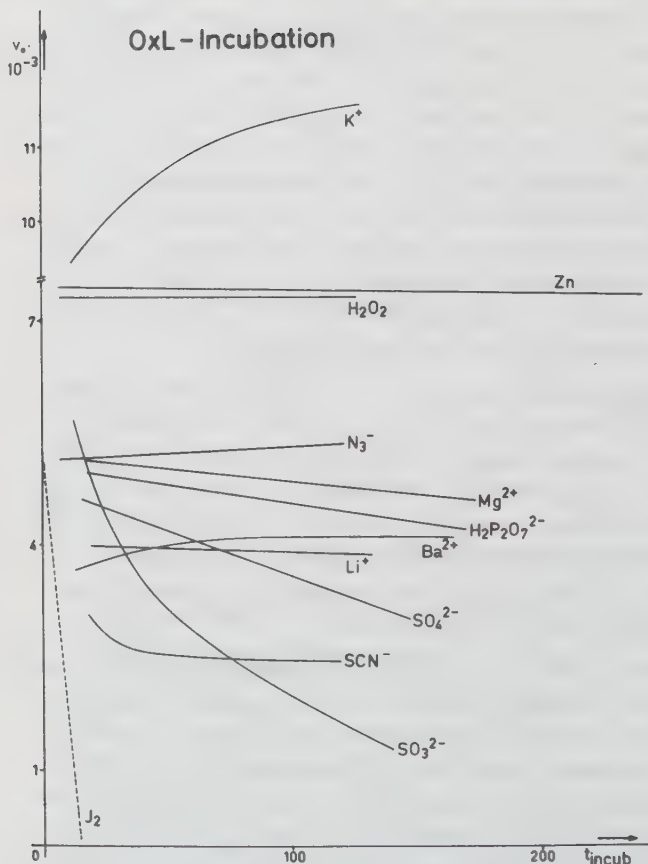
Eine entsprechende Incubation der OxL mit HCN liefert eine Aktivitätssteigerung ($t_{1/2} = 450$ min) mit fortschreitender Incubationszeit (Abb. 6). Da der erste gemessene v_o -Wert deutlich unter dem Erwartungswert für $t_{\text{incub}} = 0$ liegt und dieser Wert im Laufe der Incubation erreicht wird, verursachen die HCN-Zersetzungsprodukte dieses Phänomen. Aus diesem Grunde wirken sich die Incubationseffekte der HCN nicht auf v_o aus.

Die Incubation der OxL mit +Cyhy liefert unter analogen Bedingungen das gleiche Phänomen wie die mit BA (Abb. 6). Die Halbwertszeit der OxL-Denaturierung beträgt hier 423 min. Dieser Zeitwert liegt unter der Halbwertszeit der Denaturierung durch BA, obwohl das Verhältnis von OxL zum Einflußnehmer bei der Incubation mit +Cyhy günstiger ist als das bei der Incubation mit BA. Setzt man in Gleichung (3) Normierungswerte ein, kann gezeigt werden, daß durch geringere Substratkonzentrationen bei identischer Verminderung der nativen Enzymmenge größere Stabilitätseinbußen als bei höheren Substratkonzentrationen registriert werden müssen.

3.2.2.3 Gegen organische und anorganische Einflußnehmer

Mit welchen Salzen und Redoxmittel in 0,005 n wässrigem Acetatspuffer vom pH = 5,4 incubiert wurde und welchen

Abb. 7



OxL-Stabilität: OxL mit den Einflußnehmern incubiert, in Zeitabständen Standardmessungen mit diesen Enzymproben gefahren und v_0 gegen die Incubationszeit aufgetragen; aus Gründen der Übersicht wird auf die Wiedergabe der Meßwerte verzichtet; Substratkonzentrationen der Standardmessungen in mol/l: &) $HCN=0,751$, $BA=0,0956$; §) $HCN=0,103$, $BA=0,0981$; zugehörige Tabelle siehe nächste Seite; v-Werte in 10^{-3} mol/l·min; v-Indices: $t_0 = v$ zum Zeitpunkt $t_{\text{incub}}=0$; 1 = erste, n = letzte bestimmte v; %§: Abweichung der v_n von v_0 in %; nur angeführt, wenn Betrag größer 10;

Einfluß sie ausüben, ist in Abb. 7 angegeben. Die eingesetzten Salzkonzentrationen sind um den Faktor 10^{+3} größer als d_0 und um den Faktor 10^{-3} kleiner die Substratkonzentrationen der Standardmessung. Damit ist gewährleistet, daß die erhaltenen Effekte durch Beeinflussung der katalytisch aktiven Form der OxL entstehen und Konzentrations-effekte ausgeschlossen werden können.

Für Kationeneinflüsse wurden Chloride eingesetzt. Mg^{2+} hat keinen nennenswerten Einfluß. Li^+ und Ba^{2+} setzen die Aktivität auf ein niedrigeres Niveau, während K^+ aktivierend wirkt. Die erhaltenen Effekte können für die enzymatische Synthese als nicht spezifisch angesehen werden.

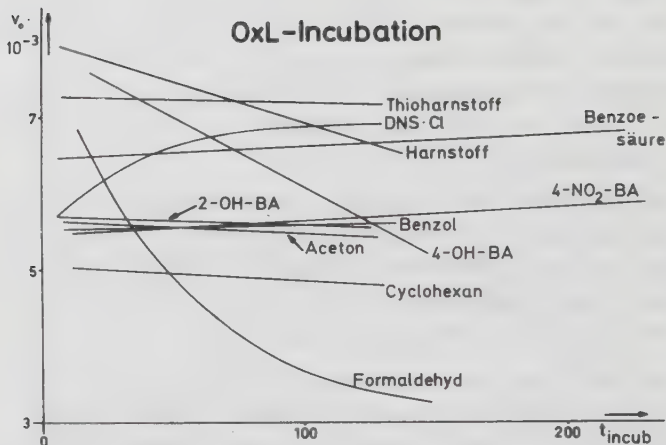
Zur Untersuchung des Anioneneinflusses wurden Na-Salze benutzt. Auffallend ist die stark negative Wirkung der $H_2P_2O_7^{2-}$ und SO_4^{2-} -Ionen. Mit einer Halbwertszeit von 434 min (Diphosphat) und 177 min (Sulfat) nimmt die katalytische Eigenschaft der OxL ab. Da beide Salze bei der Darstellung und Aufbewahrung des Enzyms verwendet werden ohne die Aktivität zu vermindern, handelt es sich um eine reversible Desaktivierung. Die zu CN^- isoelektronischen Anionen N_3^- und SCN^- beeinflussen nicht die OxL-Stabilität. SCN^- setzt deren Aktivität auf ein niedrigeres Niveau und kann daher als kompetitiver Inhibitor angesehen werden.

Die OxL-Incubation mit einfachen Redoxmitteln zeigt bei H_2O_2 und Zn eine starke Anhebung der OxL-Aktivität.

Salz		$m_0 \cdot 10^{-5}$	$d_0 \cdot 10^{-7}$	v_{t_0}	v_1	v_n	$\% \frac{v_1}{v_n}$	$\% \frac{v_1}{v_n}$	$\% \frac{v_1}{v_n}$
LiCl	&	9,09	0,46	4,64	3,93	3,72	-20	-15	-
KCl	&	8,05	1,02	10,02	10,10	11,50	+15	-	+14
MgCl ₂	&	8,75	0,50	4,99	5,05	4,60	-	-	-
BaCl ₂	&	9,07	0,50	4,95	4,05	4,01	-19	-18	-
$Na_4P_2O_7$	&	7,63	0,49	4,92	4,98	4,16	-15	-	-16
Na_2SO_4	&	10,10	0,49	4,92	4,67	3,11	-37	-	-33
NaSCN	§	11,10	1,24	5,60	3,07	2,44	-56	-45	-21
NaN ₃	§	9,56	1,24	5,60	5,39	5,17	-	-	-
J ₂	§	0,33	1,19	5,34	0,16	-	-97	-	-
Na_2SO_3	§	10,90	1,19	5,34	5,37	1,32	-75	-	-76
H_2O_2	§	6,00	1,18	5,30	7,31	7,29	+37	+38	-
Zn	§	9,44	1,18	5,30	7,46	6,99	+32	+41	-

m_0 und d_0 sind in mol/l angegeben.

Abb. 8



OxL-Stabilität: OxL mit den Einflußnehmern incubiert, in Zeitabständen Standardmessungen mit diesen Enzymproben gefahren und v_0 gegen die Incubationszeit aufgetragen; aus Gründen der Übersicht wird auf die Wiedergabe der Meßwerte verzichtet;

Substratkonzentrationen der Standardmessungen:

HCN = 0,103 mol/l; BA = 0,0981 mol/l;

v-Werte in 10^{-3} mol/l·min; v-Indices: to = v zum Zeitpunkt $t_{\text{incub}}=0$; 1 = erste, n = letzt bestimmt v;

%): Abweichung der v_n von v_0 in %, etc.; nur angeführt, wenn Betrag größer 10; m₀ und d₀ in mol/l;

Substanz	$m_0 \cdot 10^{-5}$	$d_0 \cdot 10^{-7}$	v_{to}	v_1	v_n	$\%)_n^0$	$\%)_1^0$	$\%)_n^1$
Harnstoff	11,99	1,55	6,95	8,00	6,70	-	+15	-16
Thioharn.	12,17	1,55	6,95	7,09	7,16	-	-	-
Aceton	7,87	1,23	5,52	5,63	5,44	-	-	-
Formaldehyd	8,00	1,65	7,42	6,01	3,22	-57	-19	-46
Benzoesäure	10,98	1,55	6,95	6,72	6,79	-	-	-
Dansyl-Cl	0,35	1,18	5,30	5,52	7,16	+35	-	+30
Benzol	5,43	1,23	5,52	5,55	5,59	-	-	-
Cyclohexan	4,36	1,23	5,52	5,03	4,85	-12	-	-
2-OH-BA	9,56	1,23	5,52	5,69	5,58	-	-	-
4-OH-BA	11,47	1,55	6,95	7,49	5,46	-21	-	-27
4-NO ₂ -BA	6,72	1,23	5,52	5,51	5,87	-	-	-

Dagegen zerstören Sulfitionen und noch deutlicher Jod das Enzym mit einer Halbwertszeit von 75 min (SO_3^{2-}) bzw. weniger als 8 min (J_2).

Die Incubation der OxL mit organischen Einflußnehmern erfolgte unter den angegebenen Bedingungen. Von den eingesetzten Substanzen zeigen nach Abb. 8 nur Harnstoff, Formaldehyd, Dansyl-Cl und 4-Hydroxy-benzaldehyd einen nennenswerten Einfluß. Bei Harnstoff ist auffallend, daß der v_1 -Wert deutlich gegenüber v_0 erhöht ist, während v_0 und v_n sich in etwa gleichen. Dansyl-Cl steigert die Aktivität der OxL. 4-OH-BA und Formaldehyd denaturisieren mit einer Halbwertszeit von 175 min bzw. 120 min. Cyclohexan vermindert innerhalb der ersten zwei Stunden die Aktivität der OxL geringfügig.

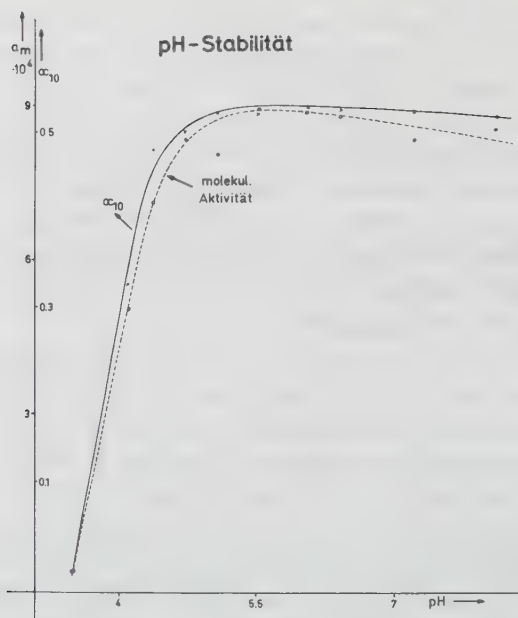
Bei der Aktivitätsbestimmung mit BaCl_2 , Benzoesäure, Benzol, Cyclohexan, 2-OH-BA, 4-OH-BA und 4- NO_2 -BA fällt sofort oder nach einigen Stunden das Apoenzym im Puffer der Standardmessung. Bemerkenswert ist die Reaktion zwischen 4- NO_2 -BA und OxL bei der Standardmessung. Das D-(+)-4- NO_2 -Cyhy wird nicht gebildet. Die Reaktionslösung färbt sich nach ca. 12 h rot. Da die Färbung nur unter Luftausschluß eintritt, kann angenommen werden, daß der Aldehyd den Isoalloxazinring des FAD's zum FAD-Semichinon reduziert. Dadurch geht die stabilisierende Wirkung der prosthetischen Gruppe auf das Apoenzym verloren, das in wässrig alkoholischem Acetatpuffer denaturiert und ausfällt.

3.2.3 Beeinflussung der asymmetrischen Synthese durch pH, Temperatur und Hydroxynitrillyase

3.2.3.1 pH-Einfluß

Enzyme sind generell nur in einem bestimmten pH-Bereich stabil und wirken meistens bei einem definierten pH optimal. Zur Überprüfung dieser Eigenschaft ist die OxL in wässrigem Acetatpuffer bei verschiedenen pH-Werten incubiert worden. Mit diesen Enzymproben wurden Standardmessungen gefahren. Die erhaltenen Ergebnisse sind graphisch in Abb 9 wiedergegeben. Unterhalb pH ca. 3,4 ist keine

Abb. 9

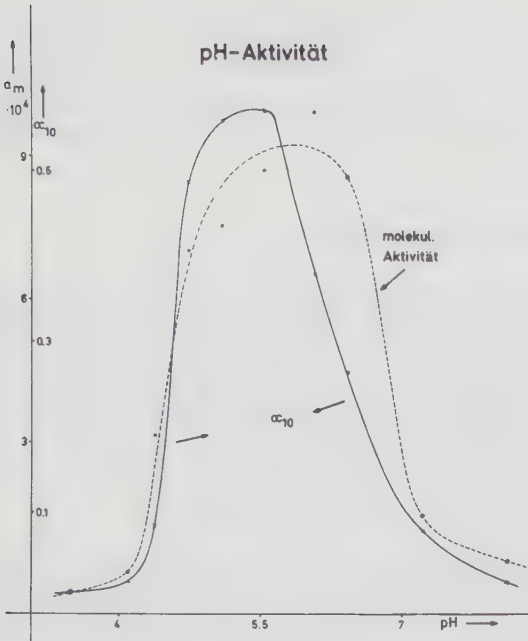


pH-Stabilität der OxL: OxL 10 min in wässrigem Acetatpuffer bei pH x incubiert; mit diesen Enzymproben Standardmessungen gefahren; den 10 min Drehwert (α_{10}) als vereinfachtes Maß der Units und die molekulare Aktivität (a_m) gegen den pH aufgetragen (vgl. Kap. 1); $a_m \cdot 1,5$ ca. spezifische Aktivität der OxL in μ mole gebildetes Produkt pro min pro mg OxL

Aktivität nach einer Incubationszeit von 10 min feststellbar; oberhalb steigen α_{10} und a_m rapide an, um dann allmählich in den optimalen Bereich zwischen pH 5 und 6 überzugehen.

Die OxL-pH-Aktivität gibt Abb. 10 wieder. Danach haben der Umsatz pro Zeiteinheit und die molekulare Aktivität unterschiedliche Maxima. Während die für den Zeitpunkt $t=0$ bestimmten a_m 's ihr Maximum bei pH ca. 6 haben, liegt das Maximum für die 10 min später erhaltenen OxL-Einheiten bei pH 5,5. Beide Maximas können alleine mit

Abb. 10



pH-Aktivität der OxL: Aktivität unter Standardbedingungen bei verschiedenen pH's; den 10 min Drehwert (α_{10}) als vereinfachtes Maß der Units und a_m gegen den pH aufgetragen; $a_m \cdot 1,5$ ca. spezif. Aktivität der OxL in μ mole gebild. Produkt pro min pro mg reines Enzym; pH-Bereich: 3,41 bis 8,05

der Affinität der OxL zu den Substraten nicht erklärt werden. Unterhalb pH ca. 4,2 zerstören Protonen die OxL. Nach Becker⁴⁾ wird OxL in Apoenzym und FAD gespalten. Unter definierten Bedingungen läuft dieser Vorgang reversibel ab, so daß die OxL wieder reaktiviert werden kann. Zwischen pH ca. 4,2 und 5,0 nimmt die denaturierende Eigenschaft der Protonen schnell ab. Der vorzeitige Abfall der α_{10} -Kurve gegenüber der a_m -Kurve zum alkalischen Bereich hin kann auf die Beschleunigung der symmetrischen Synthese durch eine erhöhte $OH^\ominus$ -Konzentration

zurückgeführt werden. Bedeutender ist die OxL-Denaturierung in wässrig alkoholischem Acetattpuffer. Kinetische Messungen bei pH ca. 6,6 lassen sich nur innerhalb der ersten eineinhalb Minuten durchführen. Danach ist die gesamte OxL denaturiert, was am ausfallenden Apoenzym zu erkennen ist.

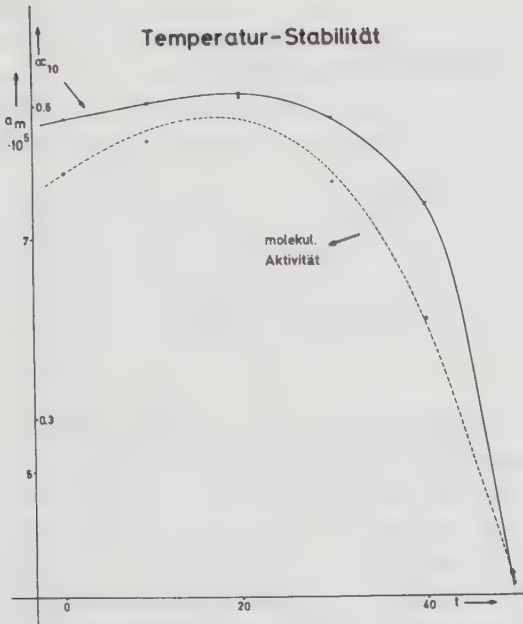
3.2.3.2 Temperatur-Einfluß

Noch komplexer als pH-Einflüsse sind Temperatureffekte auf Enzyme. Der kinetische Effekt der Temperatur auf die Reaktionsgeschwindigkeit wird überlagert vom Temperatureffekt auf die Enzymstabilität. Die Temperaturstabilität der OxL in wässrigem Acetattpuffer gibt Abb. 11 wieder. Oberhalb 30 °C treten deutliche Aktivitätseinbußen auf. Bei 50 °C ist für eine Incubationszeit von 30 min die Hälfte der nativen Enzymmenge denaturiert.

Die Temperaturaktivität der OxL zeigt Abb. 12. Der Temperatursprung der OxL bei 40 °C tritt am drastischsten im u_{sl}/t -Diagramm auf. Einem - bildlich gesehen - exponentiellen Anstieg folgt ein senkrechter Abfall. a_m steigt von 0 °C fast linear bis 40 °C an, um dann ebenso deutlich abzufallen. Der a_m -Wert bei 45 °C beträgt nur noch ein Drittel des Maximalwertes. Einen ganz anderen Verlauf zeigt die α_{end} -Kurve. Mit steigender Temperatur fallen die Enddrehwerte allmählich ab.

Die a_m -Zunahme im Temperaturbereich zwischen 0 °C und 40 °C ist auf einen kinetischen Effekt zurückzuführen. In diesem Bereich wird eine leicht glockenförmige oder sigmoide Kurve mit einem Wendepunkt bei 20 °C wiedergegeben. Diese Temperatur ist mit dem schwachen Maximum der OxL-Stabilitätskurve identisch. Unterhalb 20 °C tritt eine geringfügige Temperaturdesaktivierung der OxL ein, die nach dem α_{10} -Verlauf in Abb. 11 reversibel ist. Oberhalb 20 °C gewinnt die irreversible Proteindenaturierung an Bedeutung. Der a_m -Abfall über 40 °C ist stärker als es der Stabilitätsverlauf nach Abb. 11 erwarten läßt.

Abb. 11

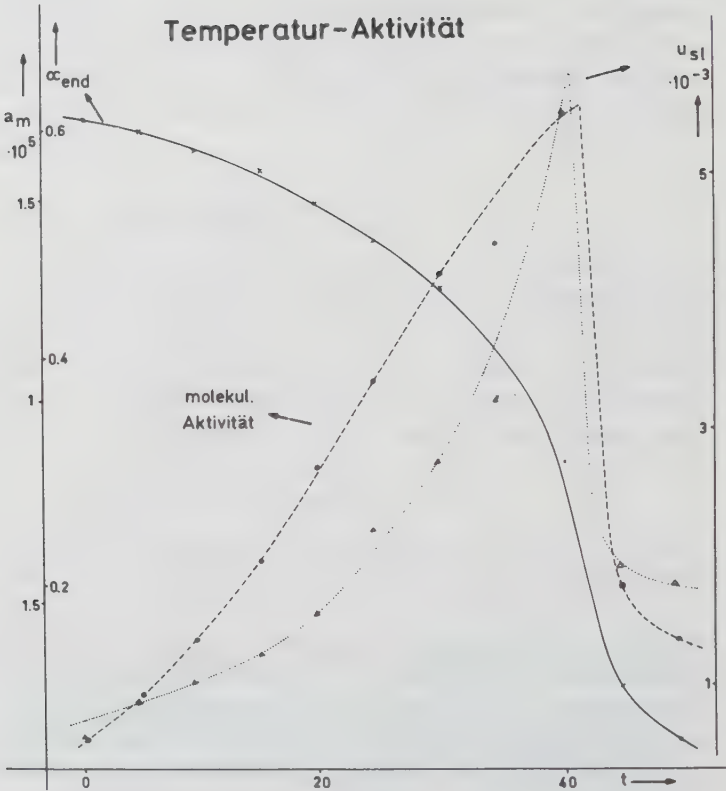


Temperaturstabilität der OxL: OxL 30 min in wässrigem Acetatpuffer bei der Temperatur x incubiert, mit diesen Enzymproben Standardmessungen durchgeführt und den 10 min Drehwert (α_{10}) neben α_m gegen die Temperatur aufgetragen; $1,5 \cdot \alpha_m$ ca. spezif. Aktivität der OxL in μ mole gebild. Produkt pro min pro mg OxL

Experimentelle Fehler, die durch Überführen der Reaktionslösung in eine abgeschlossene Meßküvette entstehen, können nicht die Ursache sein. Sie treten - wenn überhaupt - bereits ab 25°C , dem Siedepunkt der HCN, auf und machen sich nicht so abrupt, wie es Abb. 12 wiedergibt, bemerkbar. Trotzdem ist der Verlauf in diesem Bereich allein mit enzymatischen Phänomenen nicht zu erklären.

Die α_{end}/t -Kurve in Abb. 12 müßte theoretisch dem α_m -Verlauf entsprechen. Das Erreichen des Enddrehwertes wird aber auch durch die simultan ablaufende symmetrische Syn-

Abb. 12



Temperaturaktivität der OxL: Aktivität unter Standardbedingungen bei verschiedenen Temperaturen; aufgetragen sind a_m , Enddrehwert (α_{end}) und Unit (u_{sl}) gegen die Temperatur; $a_m \cdot 1,5$ ca. spezif. Aktivität in μ mole gebild. Produkt pro min pro mg OxL; Temperaturbereich: 0 °C bis 50 °C

these beeinflusst. Nach Dixon, Webb²²⁾ nimmt der Q_{10} -Faktor bei enzymatischen Reaktionen noch geringer als bei anorganischen Katalysatoren wie H^+ zu und liegt gewöhnlich zwischen 1 und 2. Vergleicht man die Geschwindigkeitskonstanten der Cyhy-Synthese für 10 °C und 20 °C - ihr Wert beträgt 0,027 bzw. 0,078 (l/mol·min) -, nimmt die symme-

trische Synthese mit einem Q_{10} -Faktor von knapp 3 wesentlich stärker als die symmetrische. Danach gewinnt der nichtenzymatische Reaktionsablauf mit steigender Temperatur an Bedeutung und verursacht durch Substratzug und Produktansammlung geringere Endkonzentrationen an +Cyhy.

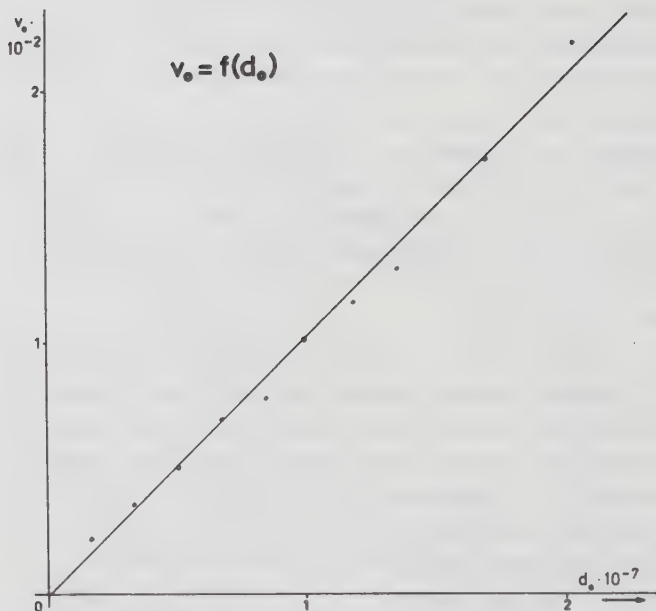
Der graphische Verlauf der u_{sl}/t -Kurve wird vom nichtenzymatischen Reaktionsweg am wenigsten beeinflusst. Durch eine Steigerung der Aktivität werden die mit zunehmender Temperatur fallenden Enddrehwerte so schnell erreicht, daß die berechneten Units exponentiell oder parabolisch bis 40 °C ansteigen. Erst wenn die OxL-Inaktivierung überwiegt, fallen die Einheiten.

Abb. 11 und 12 zeigen, daß im untersuchten Temperaturbereich die symmetrische Synthese nicht vernachlässigbar ist. Aufgrund der Temperaturstabilität und Temperaturaktivität der OxL ist für eine Untersuchung der asymmetrischen Synthese die Temperatur von 20 °C am besten geeignet. Für die präparative Darstellung der D-Cyhy'e ist 0 °C am günstigsten, da wegen der deutlich verschiedenen Q_{10} -Faktoren die unkatalysierte Reaktion stärker zurückgedrängt wird als die Aktivität der OxL.

3.2.3.3 Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit von der Hydroxynitrillyase-konzentration

Enzymatische Reaktionen werden durch Faktoren wie Konzentration an Enzym, Substrat und gebildetem Produkt, wie Einfluß von pH und Temperatur und das Agieren von Aktivatoren und Inhibitoren beeinflusst. Um Effekte von Folge- und Begleitreaktionen auszuschalten, muß die Geschwindigkeit einer Reaktion zum Zeitpunkt $t = 0$ untersucht werden. Bevor ein Enzym-Substrat-System quantitativ kinetisch untersucht werden kann, muß sichergestellt sein, daß eine direkte Abhängigkeit zwischen v_0 und der Enzymkonzentration besteht. Grundlage hierfür ist die Michaelis-Menten-Gleichung (vgl. (3)):

Abb. 13



+++Cyhy-Synthese: Standardmessungen mit verschiedenen OxL-Konzentrationen;

$(v_o)_n = 1,06 \cdot 10^{+5} \cdot (d_o)_n - 1,95 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$
 Standardabweichung für $(v_o)_n = \pm 7,3 \cdot 10^{-4}$
 Student'sches $t = 25,9$
 $t\text{-min} = 5,04 \text{ x}$
 Korrelationskoeffizient $(r) = 0,9941$
 $r\text{-min} = 0,872 \text{ x}$

x) für 0,1 % Irrtumswahrscheinlichkeit²³⁾

molekulare Aktivität (Steigung): 105.784 (1/min)
 a_m und katalytische Konstante sind identisch (vgl. Kap. 1); a_m ist von MSA zu unterscheiden (Gleichung (22)), da MSA für ein d_o von $6,8 \cdot 10^{-8} \text{ mol/l}$ gilt, während a_m für infinite d_o 's gilt; bei diesen OxL-Konzentrationen ist die symmetrische Synthese bedeutungslos.

$$(v_o)_{s=s_o} = \frac{V \cdot s_o}{K_M + s_o} = \frac{k \cdot e_o \cdot s_o}{K_M + s_o} = a_m \cdot e_o \quad (21)$$

Gleichung (21) gilt für Einsubstratreaktionen und Michaelis-Menten- bzw. Briggs-Haldane-Bedingungen. Für Mehrsub-

Zahlenwerte zu Abb. 13

Tab. 1

$v_o, \text{regress}$ $10^{-2} \text{ mol/l} \cdot \text{min}$	d_o 10^{-7} mol/l	a_m 10^5 1/min	$a_{m,n} - a_{m,(n-1)}$ $1/\text{min}$
0,16	0,17	0,943	5.700
0,34	0,34	1,000	1.920
0,52	0,51	1,020	950
0,70	0,68	1,029	580
0,88	0,85	1,035	380
1,06	1,02	1,039	270
1,24	1,19	1,041	210
1,42	1,36	1,044	290
1,78	1,70	1,046	190
2,13	2,04	1,048	240
2,85	2,72	1,051	140
3,57	3,39	1,052	190
5,37	5,09	1,054	100
7,16	6,79	1,055	280

Grenzwert (= a_m): 1,05784

stratreaktionen oder allosterische Enzyme ist a_m komplexer, bleibt aber eine Konstante, die nur von den Substratkonzentrationen abhängt, wenn man nicht im Sättigungsbereich des Enzyms mit den Substraten arbeitet.

Um den d_o -Einfluß auf v_o zu prüfen, wurden Standardmessungen mit verschiedenen d_o 's gefahren. Abb. 13 gibt den erhaltenen Verlauf wieder, während in Tab. 1 die Zahlenwerte angeführt sind. Die Ergebnisse erlauben eine quantitative Untersuchung der Kinetik der Oxl.

Tab. 1 enthält 14 Reaktionen. Die Werte in der Legende zu Abb. 13 entstanden nur aus den ersten 10 Reaktionen, da v_o bei höheren d_o 's aufgrund experimenteller Schwierigkeiten nicht exakt bestimmt werden kann. Deshalb wurden die in Tab. 1 angeführten v_o 's nach der in der Legende zu Abb. 13 angegebenen v_o/d_o -Gleichung mit den in Tab. 1 angeführten d_o 's berechnet. Nach Gleichung (5) oder (21)

läßt sich a_m unter Standardbedingungen bestimmen. Obwohl die a_m -Werte konstant sein müßten, steigen sie nach Tab. 1 gering an. Vergleicht man die Werte zwischen der n-ten und (n-1)-ten Reaktion, wird deutlich, daß die Differenzen zwischen benachbarten Aktivitäten mit steigendem d_o geringer werden, um schließlich gegen Null zu streben. Simultan dazu nähert sich a_m der einzelnen Standardmessung dem Wert des Regressionskoeffizienten. Damit ist der eigentliche Zahlenwert der molekularen Aktivität (der katalytischen Konstanten, vgl. Kap. 1) identisch mit dem Steigungswert der Regressionsgeraden. Die Konvergenz der a_m 's ist auf die symmetrische Reaktion zurückzuführen. Aufgrund der Geschwindigkeits-Konzentrations-Proportionalität entziehen zunehmende d_o 's der Cyhy-Reaktion immer mehr die Reaktionspartner, wodurch die nichtenzymatische Reaktion an Bedeutung verliert, um schließlich bei unendlichen Enzymkonzentrationen die Geschwindigkeit für den unkatalysierten Ablauf gegen Null streben zu lassen. Andererseits wird bei niedrigem d_o im Verhältnis mehr D,L-Cyhy gebildet, daß als kompetitiver Inhibitor die asymmetrische Synthese vermindert. Die OxL-Denaturierung durch BA dürfte nicht der Grund für das Ansteigen von a_m sein. Mit zunehmendem d_o würde die Denaturierungsgeschwindigkeit wachsen und geringere oder zumindest gleichbleibende Aktivitäten verursachen. Aus diesem Grunde kann die proteinchemische Reaktion unberücksichtigt bleiben.

3.3 Ermittlung des relativen Nativitätsgrades der Hydroxynitrillyase

Für die Berechnung der kinetischen Parameter aus v_o -Werten ist die Enzymkonzentration notwendig. Unkontrollierbare Einflüsse können den Betrag an nativem Enzym vermindern. Da nicht alle Messungen zum gleichen Zeitpunkt und mit der gleichen OxL-Probe durchgeführt werden können, wird aus den Gleichungen für die molekulare Aktivität (5) und für die Geschwindigkeit (1) die Konzen-

tration an nativem Enzym berechnet. Die aus den Standardmessungen erhaltenen Geschwindigkeiten $v_{o,n}$ werden als unveränderlich angesehen, da die experimentellen und rechnerischen Fehler bei der v_o -Ermittlung nach Gleichung (1) gering sind. a_m ist unter gleichen Bedingungen konstant. Damit hängt $v_{o,n}$ nach (5), (21) oder entsprechenden Gleichungen nur von der OxL-Konzentration $d_{o,n}$ ab. $d_{o,n}$ wurde zunächst über den Becker'schen⁴⁾ molaren Extinktionskoeffizienten bestimmt und nach (5) $a_{m,n}$ berechnet. Das aus der Extinktion berechnete $d_{o,n}$ gibt keine Auskunft über die native Enzymmenge und damit die wahre, katalytisch aktive OxL-Konzentration. Das Ausmaß an nativem Enzym täuscht damit über die Extinktion unterschiedliche molekularen Aktivitäten unter identischen Reaktionsbedingungen vor.

Der nach Gleichung (5) ermittelte größte a_m -Wert ist ein Maß für die größte Menge an nativem Enzym. Er gibt den Zahlenwert für die molekulare Standardaktivität MSA wieder, die als neue Bezugsgröße für die $d_{o,n}$ -Ermittlung nach (5) herangezogen wird. Bei zukünftigen Standardmessungen kann die so ermittelte MSA größer werden, da die über die Extinktion bestimmte OxL-Konzentration die MSA-Ermittlung beeinflusst. Dies bedeutet, daß der Betrag an nativem Enzym größer ist als der, der bei meiner MSA-Ermittlung vorhanden war. Für 0,1 ml BA, 0,3 ml HCN und 0,1 mg OxL in 10,3 ml wässrig alkoholischer Acetatpufferlösung bei 20 °C ist erhalten worden:

$$MSA = 1,02 \cdot 10^{+5} \text{ 1/min} \quad (22)$$

Unter analogen Bedingungen gilt für 0,1 ml BA und 0,1 ml HCN:

$$MSA' = 4,5 \cdot 10^{+4} \text{ 1/min} \quad (22a)$$

MSA wurde aus 145 Standardmessungen bestimmt. In sie gehen die Substratkonzentrationen a_o und b_o ein. Deshalb ist der ermittelte MSA-Wert auf abweichende Substratkonzentrationen nicht anwendbar (vgl. MSA'). Unter den angeführten Bedingungen läßt sich die katalytisch wirksame Menge an OxL mit den Gleichungen (5) und (22) nach (23)

berechnen:

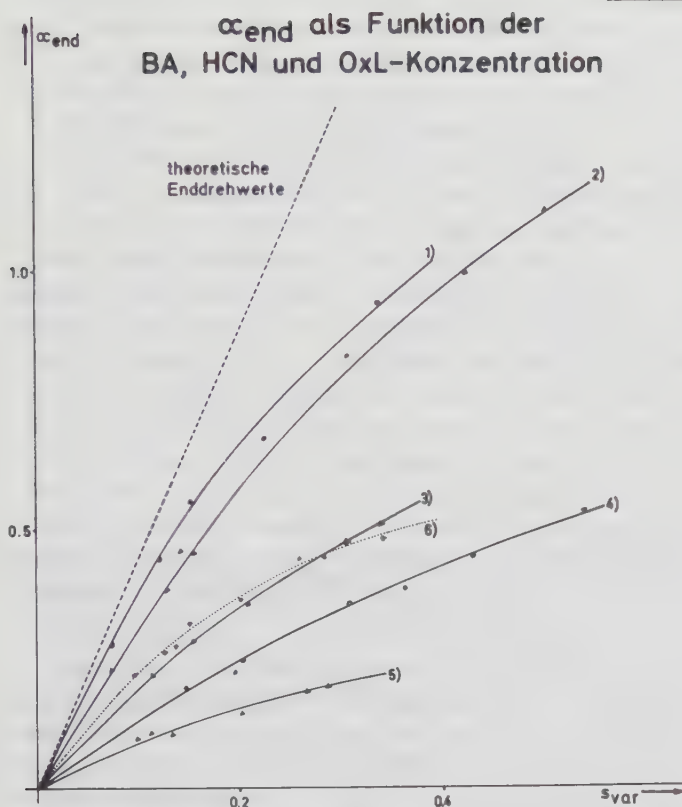
$$d_o = v_o \cdot 9,8 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l} \quad (23)$$

3.4 Bestimmung der spezifischen Drehung des D-(+)-Benzaldehyd-cyanhydrins

Für die Berechnung der Anfangsgeschwindigkeit aus Drehwertänderungen ist bei der +Cyhy-Reaktion ein exakter Wert der spezifischen Drehung notwendig, wenn man mit der Geschwindigkeitsdimension mol/l·min arbeitet.

Albers³⁾ gibt für sein Puffersystem, die Na-D-Linie und für 22 °C die spezifische Drehung mit 30,7 an. Becker⁴⁾ verglich die Werte der spezifischen Drehung in mehreren Lösungsmitteln und kam über einen Umrechnungsfaktor auf einen Wert von 33,2 bei 20 °C. Butenuth²¹⁾ berechnete über die Drehwinkelzunahme der +Cyhy-Synthese, die Extinktionsänderungen der symmetrischen und asymmetrischen Synthese die spezifische Drehung und kam auf einen Wert von 41,3 bei 15 °C in äthanolischem Acetatpuffer.

Aufgrund der unterschiedlichen Literaturwerte und der Ergebnisse aus Kapitel 3.2.1 wurde die +Cyhy-Synthese bei verschiedenen BA-, HCN- und OxL-Konzentrationen am Polariometer verfolgt. Dabei sind folgende Phänomene erhalten worden: hält man b_o und d_o konstant und variiert a_o (BA = variables Substrat), steigen die Enddrehwerte mit zunehmendem a_o ; fährt man die gleiche Reaktionsserie bei höherem b_o (HCN = fixes Substrat), erhält man ebenfalls eine Sättigungskurve. Die erreichten Enddrehwerte liegen aber unter denen, die bei einer geringeren fixen Substratkonzentration erhalten wurden. Analoges gilt, wenn BA fixes und HCN variables Substrat ist. Erhöht man d_o unter sonst identischen Bedingungen, erhält man höhere Enddrehwerte als bei niedrigeren OxL-Konzentrationen. In Abb. 14 werden diese Ergebnisse graphisch gezeigt. Bei keiner der sechs abgebildeten Kurven wird der Enddrehwert erreicht, der z. B. nach der von Becker⁴⁾ angegebenen spezifischen



±Cyhy-Synthese: Enddrehwerte bei 589 nm, 20 °C und in wässrig alkoholischen Acetatpuffer als Funktion der variablen Substratkonzentration (s_{var}) bei unterschiedlichem d_0 ; variables Substrat bei 1) und 2) HCN, bei 3) bis 6) BA;

Kurve	fixes Substrat	OxL-Konz. $\cdot 10^{-7}$
1)	BA 0,495 mol/l	3,35 mol/l
2)	BA 0,733 mol/l	3,35 mol/l
3)	HCN 0,760 mol/l	2,20 mol/l
4)	HCN 1,246 mol/l	2,20 mol/l
5)	HCN 1,944 mol/l	2,20 mol/l
6)	HCN 2,522 mol/l	6,00 mol/l

theoretische Enddrehwerte: berechnet nach der von Becker⁴⁾ angegebenen spezifischen Drehung von 33,2 für die Na-D-Linie (589 nm)

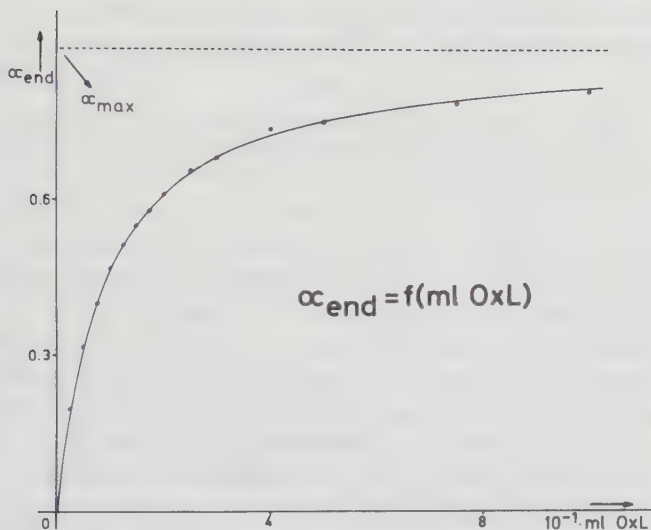
Drehung zu erwarten ist. Sie zeigen alle eine zunehmende Diskrepanz zwischen theoretischem und tatsächlichem Enddrehwert mit steigenden Konzentrationen an variablem Substrat. Ein Vergleich zwischen den Kurven 2) und 3) und den Kurven 5) und 6) verdeutlicht die Abhängigkeit des Enddrehwertes von der OxL-Konzentration; ein Vergleich zwischen den Kurven 1) und 2) und zwischen den Kurven 3) bis 5) den Einfluß der symmetrischen Synthese (v ist proportional c). Aus diesem Grunde wurde eine neue Reaktionsreihe unter den in Kapitel 1 angeführten Bedingungen bei verschiedenen d_0 's gefahren. Hier zeigt sich, daß die Enddrehwerte, aufgetragen gegen die ml OxL-Lösung (Abb. 15), sich hyperbolisch einem Maximalwert nähern. Aus diesem Grunde lag die Vermutung nahe, daß für die Berechnung der spezifischen Drehung ein Verfahren gewählt werden kann, dessen Grundlage Analogien zu den Gesetzen der chemischen Adsorption und heterogenen Katalyse aufweist. Sie werden von der Langmuir'schen Theorie beschrieben und finden in der Enzymologie eine erweiterte Anwendung.

Die chemische Adsorption beschreibt die Ausbildung monomolekularer Schichten an der Oberfläche von Adsorbentien. Der Grad der Adsorption hängt ab von der Temperatur, den Konzentrationen des Adsorbens und der eingesetzten Menge an zu adsorbierender Substanz. Hält man die Temperatur konstant, kann das Adsorbat (a) als abhängige Variable der zu adsorbierenden Substanz (c) aufgefaßt werden. Hierfür gilt:

$$a = \frac{m \cdot c}{n + c} \quad (24)$$

Gleichung (24) ist eine halbempirische Näherung, da die Aussagekraft der Konstanten n minimal ist. Erst wenn n auf anderem Wege zu deuten ist, erhält man einen Aufschluß über das molekulare Bild der Chemisorption. Gleichung (24) ist als Langmuir'sche Adsorptionsisotherme und als Michaelis-Menten-Gesetz bekannt. Trägt man a gegen c auf, erhält man einen hyperbolischen Verlauf. Die Linearisi-

Abb. 15



+Cyhy-Synthese: Enddrehwerte als Funktion der ml OxL-Lösung bei Standardmessungen ($\lambda=436\text{nm}$);
 α_{max} = theoret. Enddrehwert bei infinitem d_0 ;
 1 ml OxL-Lösung entspricht ca. 1 mg OxL;
 Differenz zwischen α_{max} und Sättigungskurve entspricht gebildetem Cyhy; Differenz zwischen Sättigungskurve und Abszisse entspricht gebildetem +Cyhy.

sierung der Gleichung (24) gelingt durch reziproke Auftragung von a gegen c .

$$\frac{1}{a} = \frac{n}{m} \cdot \frac{1}{c} + \frac{1}{m} \quad (25)$$

In die Konstante m geht die Konzentration des Adsorbens bzw. des Enzyms ein. Damit erhält man einen Proportionalitätsfaktor k , der in der Enzymkinetik unter Michaelis-Menten-Bedingungen mit der Geschwindigkeitskonstanten des Zerfalls des Enzym-Substrat-Komplexes in freies Enzym und Produkt identisch ist; für die der Chemisorption ist es im einfachsten Fall die Geschwindigkeitskonstante der Desorption des Adsorbats vom Adsorbens. Für beide gilt:

$$m = k \cdot c_{\text{adsorbens}} \quad (26)$$

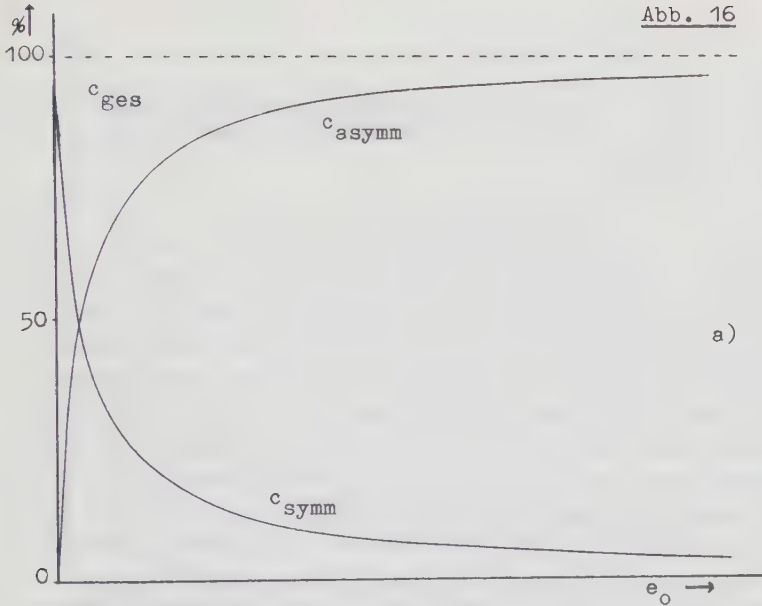
Die Konstante n entspricht der Adsorptionsgleichgewichtskonstanten bzw. der Michaeliskonstanten und hat für Gleichgewichtsbedingungen die in (27) angegebene Form:

$$k_2/k_1 = n \quad (27)$$

Index 1 gilt für die Adsorption bzw. die Enzym-Substrat-Komplexbildung, Index 2 für die Desorption bzw. den Zerfall des ES-Komplexes in Enzym, Substrat

Einen Sättigungsverlauf zwischen α_{end} und OxL-Menge gibt Abb. 15 wieder. Aufgrund dieser Kurve liegt in Analogie zur Chemisorption, heterogenen Katalyse und Enzymologie die Vermutung nahe, daß in diesem Fall das Adsorbens HCN/BA, das Adsorbat +Cyhy und die zu adsorbierende Substanz OxL ist. Bei der Chemisorption sind Adsorbat und zu adsorbierende Substanz identisch und unterscheiden sich nur dadurch, daß sie adsorbiert sind oder sich in Lösung befinden, wonach OxL nur formal die Funktion der zu adsorbierenden Substanz übernimmt. In der Enzymkinetik entspricht v_0 dem Adsorbat. Sie resultiert aus der Wechselwirkung zwischen Adsorbens (Enzym) und zu adsorbierender Substanz (Substrat), was zum gleichen Ergebnis wie bei der Chemisorption führt, nur wird in diesem Fall auf die Umwandlung der zu adsorbierenden Substanz (HCN, BA) eingegangen, wodurch die Identität zwischen Adsorbat (+Cyhy) und zu adsorbierender Substanz offenbar wird. Damit erhält man im vorliegenden Fall den gleichen hyperbolischen Verlauf wie nach der Langmuir'schen Theorie und in der Enzymkinetik. Hier wird nur statt der zu adsorbierenden Substanz das Adsorbat selbst variiert.

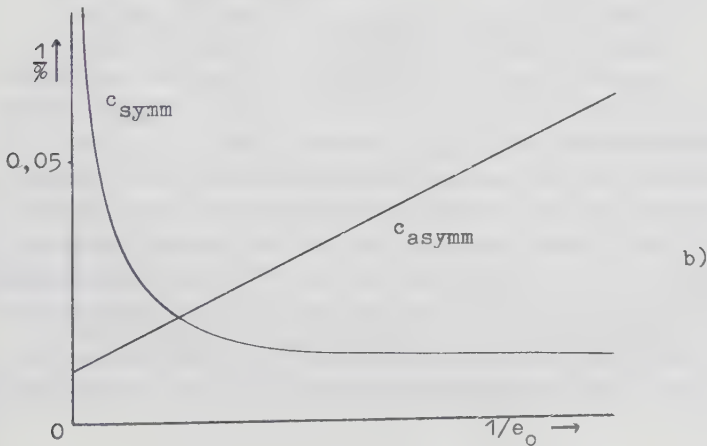
Die Deutung der Sättigungskurve mit kinetischen Mitteln zeigt folgendes. Die Gesamtmenge an Cyanhydrin gleicht der Summe aus symmetrischem und asymmetrischem Cyanhydrin. OxL hat einen direkten Einfluß auf die +Cyhy-Bildung. Qualitativ verdeutlicht dies der $\alpha_{\text{end}}/\text{ml}$ OxL-Verlauf in Abb. 15. Eine vereinfachte quantitative Beziehung zwischen dem gebildeten symmetrischen und dem gebildeten asymmetrischen Produkt gibt Gleichung (28) wieder (vgl. Gleichung (1), (2) und (21) mit (36)):



Enzymatischer Einfluß auf symmetrische Synthesen:

a) oben: mit zunehmender Enzymkonzentration nimmt nach Gleichung (28), (28a) das optisch inaktive Produkt ab; im gleichen Sinne wird die Gleichgewichtseinstellung verkürzt (ein $\Delta t/e_0$ -Verlauf entspricht der c_{symm} -Kurve)

b) unten: doppelreziproke Auftragung der Werte der Abb. 16a



$$\frac{\Delta c_{\text{ges}}}{\Delta t} = \frac{k' \cdot a_0}{K_M + a_0} \cdot e_0 + k'' \cdot a_0 \quad (28)$$

Setzt man für $k' \cdot a_0 / (K_M + a_0)$ und $k'' \cdot a_0$ solche Normierungswerte ein, daß beide Ausdrücke den Wert eins haben, gilt nach Umformen:

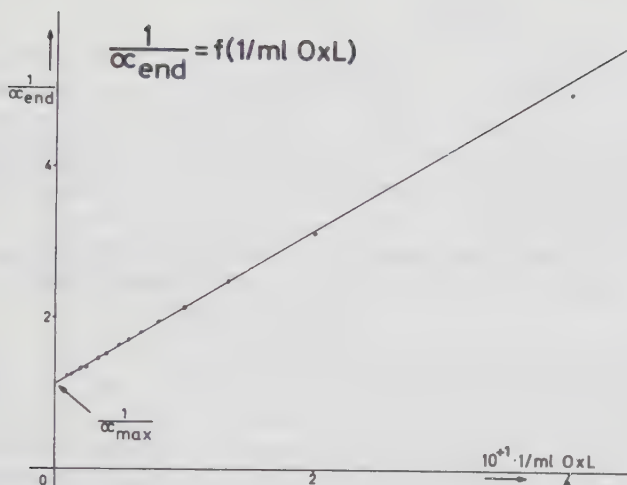
$$\Delta c_{\text{ges}} = 1 \cdot e_0 \cdot \Delta t + 1 \cdot \Delta t \quad (28a)$$

Ist $e_0 = 0$, wird ausschließlich symmetrischen Produkt gebildet. Mit steigendem e_0 nimmt Δt ab und der Betrag an optisch aktivem Produkt zu. Abb. 16a verdeutlicht dies. Obwohl der c_{asym} - und der c_{sym} -Verlauf spiegelbildlich zueinander liegen, kann nur die c_{asym} -Kurve durch doppelreziproke Auftragung linearisiert werden (Abb. 16b). Die Ursache liegt in beiden Geschwindigkeitsgleichungen. Für enzymatische Reaktionen wird ein hyperbolischer Verlauf gefordert, für chemische ein exponentieller. Die Abb.'en 15, 16a und 16b zeigen, daß die durch OxL beschleunigte Bildung des D-Epimeren des Benzaldehydcyanhydrins mit Gesetzen der heterogenen Katalyse und der Langmuir'schen Adsorptionsisothermen beschrieben werden kann und daß die Sättigungskurve in Abb. 15 nicht durch zufällig aufeinander abgestimmte kinetische Werte zwischen der symmetrischen und der asymmetrischen Reaktion verursacht wird.

Vor einer weiteren Erörterung muß geprüft werden, ob durch doppelreziproke Auftragung eine Gerade entsteht. Nur auf diese Weise sind der maximal mögliche Enddrehwert und bei molarer Auftragung ($1/\text{mol}_{\text{end}}$ gegen $1/d_0$) eine Art Affinitätskonstante (n in Gleichung (24), (27)) exakt zu bestimmen. Abb. 17 gibt den Verlauf der postulierten Geraden wieder. Der Student'sche t -Wert und die Mindestkorrelation dieser Geraden bestätigen, daß der Kurvenverlauf in Abb. 15 hyperbolisch ist und der theoretische Enddrehwert aus dem Ordinatenabschnitt der doppelreziproken Auftragung (Abb. 17) erhalten werden kann.

Die Synthese optisch aktiver Verbindungen beruht nach

Abb. 17



+Cyhy-Synthese: doppelreziprokes Diagramm zur Ermittlung des theoretischen Enddrehwertes (die Werte entsprechen denen der Abb. 15); $\alpha_{\max}$ entspricht zahlenmäßig dem reziproken Ordinatenabschnitt;

$$\begin{aligned} (1/\alpha_{\text{end}})_n &= 101,7 \cdot (1/\text{ml O x L})_n + 1,13 & (w) \\ \text{Standardabweichung für } (1/\alpha_{\text{end}})_n &= \pm 0,0143 \\ \text{Student'sches } t &= 133,9 \\ t\text{-min} &= 4,22 & (x) \\ \text{Korrelationskoeffizient } (r) &= 0,9997 \\ r\text{-min} &= 0,76 & (x) \\ (x): &\text{für } 0,1 \% \text{ Irrtumswahrscheinlichkeit}^{23)} \\ (w): &\text{bei molarer Auftragung } (1/\text{mol}_{\text{end}} \text{ gegen } 1/d_o) \text{ gilt mit (40):} \\ &(1/\text{mol}_{\text{end}})_n = 6,877 \cdot 10^{-7} \cdot (1/d_o)_n + 10,94 \end{aligned}$$

Kuhn²⁴⁾ auf einem endlichen Unterschied in der Bildungsgeschwindigkeit beider Enantiomeren. Aus Abb. 5 geht hervor, daß die symmetrische Synthese unter Standardbedingungen sehr schnell abläuft. Sie muß deshalb bei der Berechnung der spezifischen Drehung berücksichtigt werden.

Im Gleichgewicht der Cyhy-Reaktion sind $(a_o - c)$ mol BA, $(b_o - c)$ mol HCN und c mol D,L-Cyhy vorhanden. Nach dem Massenwirkungsgesetz gilt für die Cyhy-Spaltung in BA und

$$\text{HCN:} \quad K_{\text{diss}} = \frac{(a_0 - c)(b_0 - c)}{c} \quad (29)$$

Auflösen nach c ergibt:

$$c_{1,2} = \frac{a_0 + b_0 + K_{\text{diss}}}{2} \pm \sqrt{\left(\frac{a_0 + b_0 + K_{\text{diss}}}{2}\right)^2 - a_0 \cdot b_0} \quad (30)$$

Nur c_1 oder c_2 ist chemisch sinnvoll und der zutreffende Wert muß kleiner sein als die geringste der beiden Konzentrationen a_0 und b_0 .

Für die Berechnung der Konzentration an Cyhy (c_{symm}) wird Gleichung (7) benutzt, die nach Umformen lautet:

$$c_{\text{symm}} = \frac{b_0 \cdot (1 - e^{(b_0 - a_0) \cdot k_{\text{sym}} \cdot \Delta t})}{1 - \frac{b_0}{a_0} \cdot e^{(b_0 - a_0) \cdot k_{\text{sym}} \cdot \Delta t}} \quad (31)$$

wobei k_{sym} die Geschwindigkeitskonstante der Cyhy-Synthese ist und Δt das Zeitintervall, in dem c_{symm} gebildet wird.

Für die Berechnung der Konzentration an gebildetem +Cyhy (c_{asym}) wird die Geschwindigkeitsgleichung für Einsubstratreaktionen zugrundegelegt:

$$v_0 = \frac{\Delta c}{\Delta t} = a_m \cdot d_0 = \frac{k' \cdot a_0}{K + a_0} \cdot d_0 \quad (32)$$

k' = Geschwindigkeitskonstante; K = Gleichgewichtskonstante (vgl. Gleichung (3), (4) und (21))

Für c_{asym} gilt nach (32):

$$c_{\text{asym}} = \Delta c = a_m \cdot d_0 \cdot \Delta t \quad (33)$$

a_m ist nach (32) nur in einem Falle von a_0 abhängig. Die Gleichungen (34a) bis (34c) verdeutlichen dies:

$$\text{für } a_0 \ll K: a_m = (k'/K) \cdot a_0 \quad (34a)$$

$$\text{für } a_0 \gg K: a_m = k' \quad (34b)$$

$$\text{für } a_0 = K: a_m = k'/2 \quad (34c)$$

Sind die Bedingungen, die zu (34a) führen, erfüllt, muß a_m nach (34a) in Gleichung (33) mit a_t/a_0 (a_t = BA-Konzentration zur Zeit t) multipliziert werden, da die Gleichungen (32) und (33) für v_0 gelten.

Für die einzelnen Relationsgleichungen ist der K -Wert

zumindest größenmäßig notwendig. Deshalb kommt es nicht darauf an, die wahren kinetischen Parameter V und K_M nach Gleichung (3) oder analogen zu bestimmen. b_0 ist bei der Standardmessung ca. acht mal größer als a_0 . Die MSA-Werte (Gleichung (22) und (22a)) zeigen, daß bei diesem b_0 OxL mit dem Substrat fast gesättigt ist. Daher kann der b_0 -Einfluß auf a_m und damit auf k' und K als untergeordnet angesehen werden. Unter diesen Voraussetzungen berechnen sich die Konstanten k' und K nach der integrierten Form der v_0 -Gleichung für Einsubstratreaktionen (21):

$$\frac{1}{t} \cdot \ln \frac{a_0}{a_0 - c_t} = \frac{k' \cdot d_0}{K} - \frac{1}{K} \cdot \frac{c_t}{t} \quad (35)$$

in der t die Zeit und c_t das gebildete Produkt zur Zeit t sind. Die c_t -Bestimmung ist bereits eine Vorwegnahme des noch zu bestimmenden Umrechnungsfaktors für Drehwerte in Konzentrationswerte. Da die k' - und K -Ermittlung nur für die Relationsgleichungen (34a) bis (34c) benötigt wird, kann der aus der Geradengleichung in der Legende zu Abb. 16 berechnete Maximaldrehwert in Beziehung zu a_0 gesetzt und über diesen Umrechnungsfaktor c_t berechnet werden. Damit sind in der linearen Gleichung (35) nur k' und K unbekannt, deren Wert man aus den Achsenabschnitten erhält.

Teilt man die Einstellzeit des Enddrehwertes in diskrete Zeitintervalle, ist die gebildete Menge an Gesamtcyanhydrin (c_{ges}) die Summe der asymmetrischen und symmetrischen Produktkonzentrationen, die für jedes Zeitintervall nach Gleichung (31) und (33) ermittelt wurden:

$$c_{ges} = \sum_{i=1}^n c_{symm,i} + \sum_{i=1}^n c_{asym,i} \quad (36)$$

Für die Berechnung der Teilkonzentrationen ist nach jedem Summierungschritt a_0 um den Betrag an Gesamtcyanhydrin zu vermindern, der bis zu dem betreffenden Zeitpunkt gebildet worden ist. n in Gleichung (36) betrug ca. 3000. Die erhaltenen Konzentrationswerte gibt Gleichung (36a) in der Reihenfolge von (36) an:

$$9,519 \cdot 10^{-2} = (0,450 + 9,068) \cdot 10^{-2} \text{ mol/l} \quad (36a)$$

Aus dem berechneten +Cyhy-Anteil wird die Konzentration in g/100 ml (c_{spez}) ermittelt, die für die Berechnung der spezifischen Drehung nach (37) benötigt wird.

$$[\alpha]_{436}^{20} = \frac{100 \cdot \alpha_{\text{max}}}{d_m \cdot c_{\text{spez}}} = 73,35 \quad (37)$$

d_m ist die Schichtlänge der Polarimeterküvette in Dezimeter. Für die Na-D-Linie (589 nm) gilt unter sonst identischen Bedingungen: 32,96. Dieser Wert liegt geringfügig unter dem Becker'schen⁴⁾ und deutlich unter dem von Butenuth²¹⁾ angegebenen.

Für die Bestimmung der spezifischen Drehung nach dieser Methode sind die Dissoziations- und Geschwindigkeitskonstanten der symmetrischen Reaktion notwendig. Sie sind in Kapitel 2 angegeben. Die nach Gleichung (35) aus 14 Reaktionen berechneten k' - und K -Werte lauten:

$$K = 0,1169 \pm 0,0044 \text{ mol/l}$$

$$k' = (3,023 \pm 0,632) \cdot 10^{+4} \text{ 1/min} \quad (38)$$

$$\text{für } d_o = 2 \cdot 10^{-7} \text{ mol/l ist } V = 6 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l} \cdot \text{min}$$

Da diese Werte für die Relationsgleichungen benötigt werden und die Fehler bei der α_{max} - und a_m -Ermittlung so klein sind, daß sie vernachlässigt werden können (siehe Abb. 17 und Kap. 3.2.3.3), wird für die Umrechnung der Drehwerte in molare +Cyhy-Konzentrationen die in Gleichung (37) angegebene spezifische Drehung benutzt. Für den Umrechnungsfaktor a_{um} gilt:

$$a_{\text{um}} = \frac{1000}{M_{\text{G}_{\text{Cyhy}}} \cdot [\alpha] \cdot d_m} = 0,10238 \quad (39)$$

wobei $M_{\text{G}_{\text{Cyhy}}}$ das Molekulargewicht des Cyanhydrins ist. Die +Cyhy-Konzentration (c_+) läßt sich nach (40) mit dem gemessenen Drehwinkel (α) bestimmen:

$$c_+ = a_{\text{um}} \cdot \alpha \text{ (mol/l)} \quad (40)$$

Die Bestimmung der spezifischen Drehung substituierter BA'e kann nach der gleichen Methode erfolgen. Da die symmetrische Reaktion mit R-BA'en kinetisch nicht untersucht wurde, können in dieser Arbeit nur Mindestwerte für die spezifische Drehung der D-Cyhy'e angegeben werden (siehe

exp. Teil, Kap. 5.2). Optische Reinheit ist für die durch OxL gebildeten D-Cyhy'e theoretisch nur bei infinitem d_0 zu erreichen. Mit relativ geringen Enzymmengen erhält man aber sehr hohe optische Ausbeuten. Für +Cyhy kann durch Umkristallisieren in Bromäthan optische Reinheit erreicht werden (siehe exp. Teil, Kap. 2.3).

In Abb. 15 und 17 sind die erreichten Enddrehwerte gegen die eingesetzten ml OxL-Lösungen direkt oder reziprok aufgetragen. Setzt man statt dessen deren molare Konzentrationswerte ein, kann die in Gleichung (24) und (27) angeführte Konstante n qualitativ und quantitativ gedeutet werden. Für die Chemisorption ist n definiert als das Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten der Desorption zur Adsorption. Faßt man die Cyhy-Reaktion (6) als Gesamtheit auf, wobei die BA/HCN-Umwandlung zum Cyhy eine untergeordnete Rolle spielt, deutet der geringe n -Wert von $6,29 \cdot 10^{-8}$ mol/l auf eine äußerst starke Wechselwirkung zwischen einem der Substrate und OxL hin, da die Geschwindigkeit einer OxL-Substrat-Komplexbildung nach dem n -Wert und dessen Definition ca. 10^9 mal größer sein muß als die Geschwindigkeit für den Zerfall in freies Enzym und Substrat. Das aus n berechnete ΔG^0 von +7,57 kcal/mol, etwa vergleichbar mit der freien Standardbildungsenthalpie von CS_2 , SiH_4 oder NO_2 ²⁵⁾, sagt aus, daß die Reaktion nur in Richtung einer Anlagerung der Substrate im thermodynamischen Sinne freiwillig abläuft. Da BA die Fluoreszenz der OxL ganz löscht und HCN dies nicht tut, kann man n als Dissoziationskonstante eines OxL-BA-Komplexes auffassen, der in freie OxL und BA zerfällt. Diese Deutungsart führt zur Annahme, daß eine Bindung, die stärker ist als van der Waals'sche Kräfte, zwischen OxL und BA gebildet wird.

Im enzymologischen Sinne ist n vergleichbar mit der Michaeliskonstanten. Beide entsprechen dem Konzentrationswert, der den halbmaximalen Wert liefert, nämlich die Maximalgeschwindigkeit in der Enzymkinetik bzw. die maxi-

mal mögliche +Cyhy-Konzentration im vorliegenden Fall. Der Konzentrationswert bezieht sich hier auf die variierte OxL-Menge und nicht auf die der Substrate. n gibt damit die OxL-Konzentration an, die 50 % optische Ausbeute bei den angeführten Substratkonzentrationen garantiert. In Analogie zur Michaeliskonstanten kann man n als asymmetrische Konstante (a_k) bezeichnen.

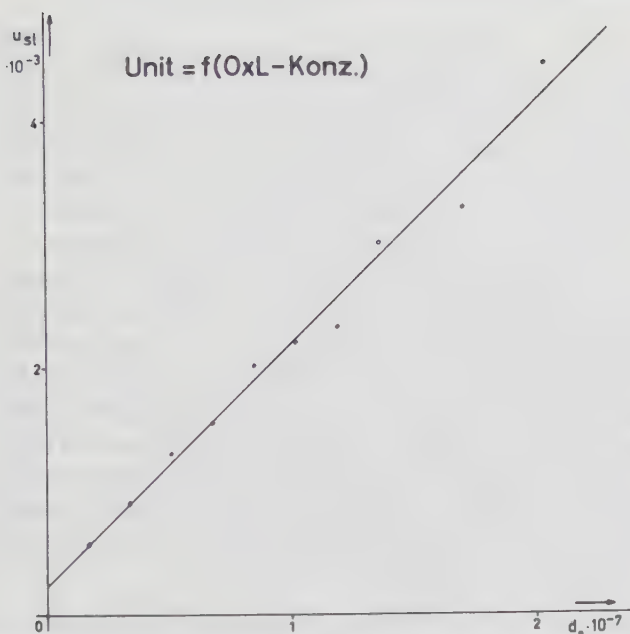
3.5 Syntheseleistung der Hydroxynitrillyase

Die Abhängigkeit des Enddrehwertes von den BA-, HCN- und OxL-Konzentrationen geben Abb. 14 und 15 wieder. In Kapitel 3.4 ist deren Einfluß auf die asymmetrische Synthese beschrieben worden. Da OxL nur die Bildung des D-Epimeren beschleunigt, ist ihre Variation am besten für die Definition einer Syntheseleistung geeignet. Unter konstanten Bedingungen beeinflusst OxL nur den Enddrehwert und die Zeit, in der er erreicht wird. Aus Abb. 13 geht hervor, daß v_o der +Cyhy-Synthese mit steigendem d_o zunimmt. Gleichzeitig verringert sich die Einstellzeit der in Abb. 15 wiedergegebenen Enddrehwerte (vgl. Abb. 16). Mit Gleichung (40) lassen sich die molaren Konzentrationen berechnen. Die OxL-Einheiten werden nach Gleichung (5a) ermittelt.

Trägt man u_{s1} gegen d_o auf, erhält man eine Gerade, deren Verlauf in Abb. 18 wiedergegeben ist. In Kapitel 3.2.3.3 wird gezeigt, daß der Steigungswert eines v_o/d_o -Diagramms der molekularen Aktivität der OxL entspricht. Analog kann man den in der Legende zu Abb. 18 angeführten Wert der Steigung als Syntheseleistung definieren, die die Aktivität der OxL im Hinblick auf die Synthese des +Cyhy's ausdrückt.

Die Gerade in Abb. 18 geht nicht durch den Koordinatenursprung, da die Zeiten, innerhalb derer die Enddrehwerte erreicht werden, zu niedrig liegen. Ursache ist die Anzeigegenauigkeit des Polarimeters. Der in Abb. 15 angegebene größte α_{end} -Wert wird am Polarimeter nach 4 bis

Abb. 18



Syntheseleistung der OxL: Standardmessungen bei verschiedenen d_o 's (10^{-7} mol/l entsprechen 0,736 mg native OxL); u_{sl} = Units, berechnet nach (5b), der Zeitwert entspricht dem Reaktionsende; $(u_{sl})_n = 1,97 \cdot 10^4 \cdot (d_o)_n + 2,29 \cdot 10^{-3}$

Standardabweichung $(u_{sl})_n = \pm 1,9 \cdot 10^{-4}$

Student'sches t = 18,67

t-min = 4,22 (x)

Korrelationskoeffizient (r) = 0,9887

r-min = 0,76 (x)

(x) für 0,1 % Irrtumswahrscheinlichkeit²³⁾

Syntheseleistung: 19.700 (1/min)

5 min angezeigt. Die nach Gleichung (30) ermittelte Menge an Gesamtcyanhydrin wird erst nach 6,02 min erreicht, wenn man sie nach (36) berechnet. Da nur die Geradensteigung von Interesse ist und die Linearität gegeben ist, kann die Verschiebung der Geraden unberücksichtigt bleiben.

4 Modifiereinfluß auf die asymmetrische Synthese

Führt man Standardmessungen, muß in Gegenwart eines Modifiers v_o einen anderen als den über MSA (Gleichung (22)) berechneten Wert annehmen, wenn der Modifier einen Einfluß auf den enzymkatalysierten Reaktionsweg ausübt. Bei dieser experimentellen Methode kann nur entschieden werden, ob ein Einfluß besteht und wenn, ob es sich um eine Aktivierung oder Hemmung handelt. Um die Einflußnahme entscheiden zu können, wurde v_o gegen die Modifikonzentration m_o (primäres Diagramm), $1/v_o$ gegen $1/m_o$ (sekundäres Diagramm) und $1/v_o$ gegen m_o (tertiäres Diagramm) aufgetragen. Ein Aktivator wird v_o mit zunehmender Eigenkonzentration erhöhen, so daß im doppelreziproken Diagramm ebenfalls ein zunehmender Funktionsverlauf zu erwarten ist. Da in einem solchen Fall v_o proportional m_o ist, muß im tertiären Diagramm ein abfallender Funktionsverlauf bestehen. Für einen Inhibitor gelten die jeweils umgekehrten Beziehungen.

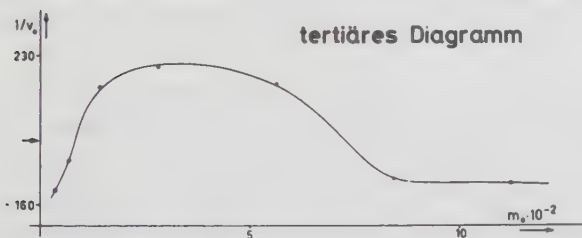
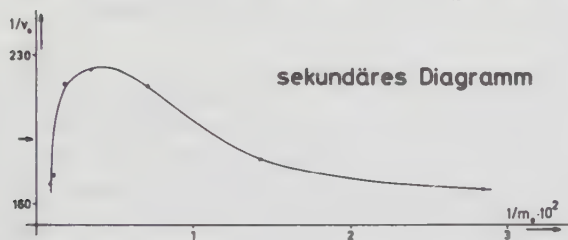
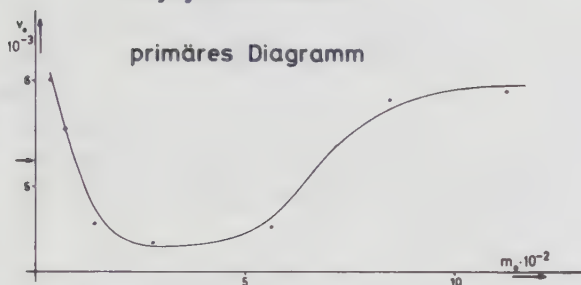
Die Art und Weise der Modifizierung zu deuten ist mit dieser Methode nur auf indirektem Wege möglich. Benutzt man die integrierte v_o -Gleichung (35) für Einsubstratreaktionen, kann ein Quasi- K_M (K) und ein Quasi-V (V) berechnet werden. Wird K oder V durch den Modifier verändert, ist es möglich, zwischen kompetitiver, nonkompetitiver und gemischter Hemmung oder Aktivierung zu unterscheiden. Die angegebenen V-Werte beziehen sich auf eine OxL-Konzentration von $2 \cdot 10^{-7}$ mol/l. Die Geraden, aus denen die jeweiligen K- und V-Werte berechnet wurden, sind mit weniger als 0,1 % Irrtumswahrscheinlichkeit linear.

4.1 +Cyhy als Modifier

Führt man Standardmessungen in +Cyhy-Gegenwart, kann der Produkteinfluß auf die +Cyhy-Synthese untersucht werden. +Cyhy sollte aufgrund seiner Struktur ein compe-

Abb. 19

•Cyhy als Modifizier



+Cyhy-Synthese: Standardmessungen in +Cyhy-Gegenwart;
 v_0 ist in mol/l·min, m_0 (+Cyhy-Konz.)

in mol/l angegeben; HCN = 0,103, BA = 0,0981, OxL =
 $1,19 \cdot 10^{-7}$ mol/l; Pfeile, die auf die Ordinate zeigen,
 geben den v_0 -Wert für $m_0 = 0$ an;

K- und V-Werte (berechnet nach (35) für jede Reaktion)

$m_0 \cdot 10^{-2}$	$K \cdot 10^{-2}$	$V \cdot 10^{-4}$	$m_0 \cdot 10^{-2}$	$K \cdot 10^{-2}$	$V \cdot 10^{-4}$
mol/l	mol/l	mol/l·min	mol/l	mol/l	mol/l·min
0,35	9,0	3,68	5,62	9,6	0,19
0,70	9,3	1,33	8,43	9,5	0,29
1,41	8,9	4,13	11,25	9,5	0,26
2,81	9,2	1,83			

titiver Inhibitor für BA beim enzymatischen Reaktionsablauf
 sein. Die einzelnen v_0/m_0 -Diagramme (Abb. 19) zeigen keinen

einheitlichen +Cyhy-Einfluß. Bei niedrigem m_0 tritt Hemmung auf, bei hohem m_0 aktiviert +Cyhy. Außerdem liegen einige v_0 -Werte über dem Erwartungswert für $m_0 = 0$. Ein deutlicheres Ergebnis als die wiedergegebenen Diagramme liefern die in der Legende zu Abb. 19 angeführten K- und V-Größen. Danach beeinflußt +Cyhy nicht die Quasi-Michaeliskonstante für die +Cyhy-Synthese, sondern nur die Quasi-Maximalgeschwindigkeit. Danach hemmt +Cyhy den enzymatischen Reaktionsablauf noncompetitiv.

4.2 Salze, Carbonyl- und organische Verbindungen als Modifizier

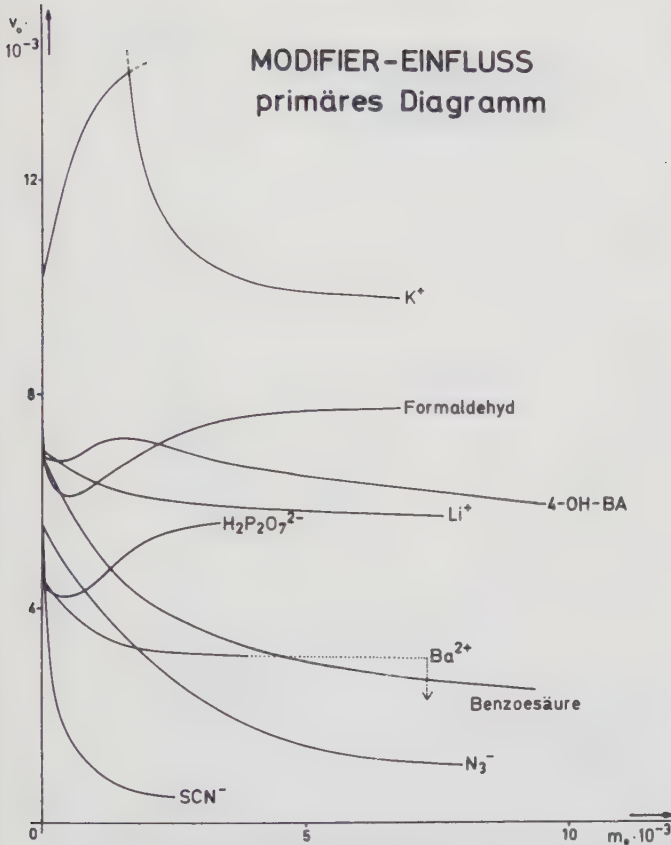
Von den untersuchten Modifiern zeigen Sulfat, Aceton, Benzol, 4-NO₂-BA und 2-OH-BA keinen nennenswerten Einfluß. Harnstoff und Thioharnstoff lassen v_0 leicht ansteigen, heben sich aber von den vorher genannten Substanzen nicht deutlich ab. Analoges gilt für Magnesiumionen und Cyclohexan, die v_0 gegenüber dem Erwartungswert für $m_0 = 0$ senken.

Die Wirkung von KCl, LiCl, BaCl₂, Na₂H₂P₂O₇, NaN₃, NaSCN, HCHO, C₆H₅COOH und 4-OH-BA auf v_0 der asymmetrischen Synthese gibt Abb. 20 wieder. Von ihnen zeigen im sekundären Diagramm (Abb. 21) nur SCN[⊖], N₃[⊖] und C₆H₅COOH einen eindeutigen Einfluß. Alle drei kommen wegen ihrer Substratähnlichkeit als competitive Inhibitoren in Frage. Die erhaltenen Kurven gleichen den Mustern, die man für substrathemmende Stoffe erhält. Der im tertiären Diagramm (Abb. 22) für diese drei Modifizier angegebene Verlauf läßt eine Angabe von Inhibitionskonstanten nicht zu.

Von den restlichen in Abb. 19 angeführten Modifiern kann eine für die Katalyse spezifische Wirkung nicht angenommen werden. Mit Ba²⁺ fällt bei hohen Konzentrationen das Apo-Enzym. Li⁺ bestätigt den negativen Einfluß, während 4-OH-BA einen gering wechselnden auf v_0 ausübt. Die denaturierende Wirkung des Formaldehyds wird bei höheren m_0 's zumindest für den Reaktionsbeginn aufgehoben.

Abb. 20

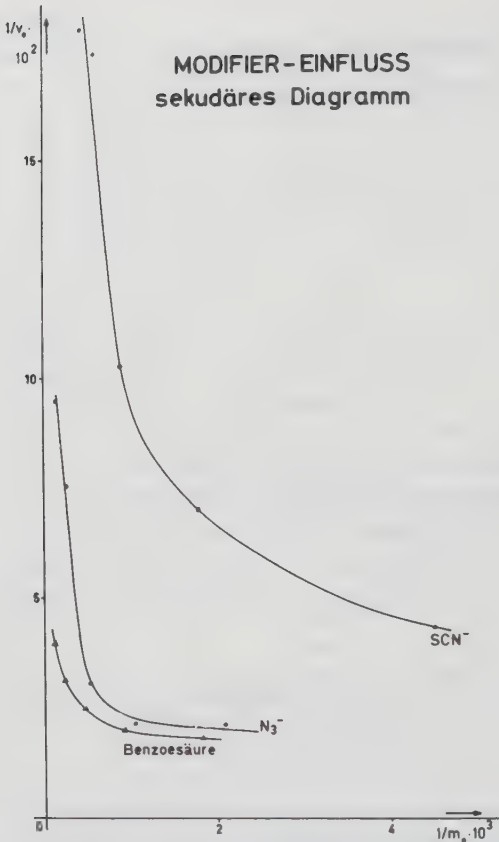
MODIFIER-EINFLUSS primäres Diagramm



+Cyhy-Synthase: Standardmessungen in Gegenwart von Modifiern; Ausgangspunkt jeder Kurve ist der v_0 -Erwartungswert für $m_0 = 0$; Substratkonzentrationen für Li^+ , K^+ , Ba^{2+} , $\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7^{2-}$: $\text{HCN} = 0,751$, $\text{BA} = 0,0956$ mol/l; für SCN^- , N_3^- , Formaldehyd, Benzol und 4-OH-BA: $\text{HCN} = 0,103$, $\text{BA} = 0,0981$ mol/l; v_0 ist in mol/l·min, m_0 in mol/l angegeben

Die bei der Incubation festgestellte desaktivierende Eigenschaft der Dihydrogen-diphosphationen wird nur für geringe Konzentrationen bestätigt. Die aktivierende Eigenschaft der Kaliumionen wird bei hohen Eigenkonzentrationen aufgehoben. Hier treten Aktivitätsunterschiede von 30 % auf. Die nach (35) berechneten K- und V-Werte liefern keine ergänzenden

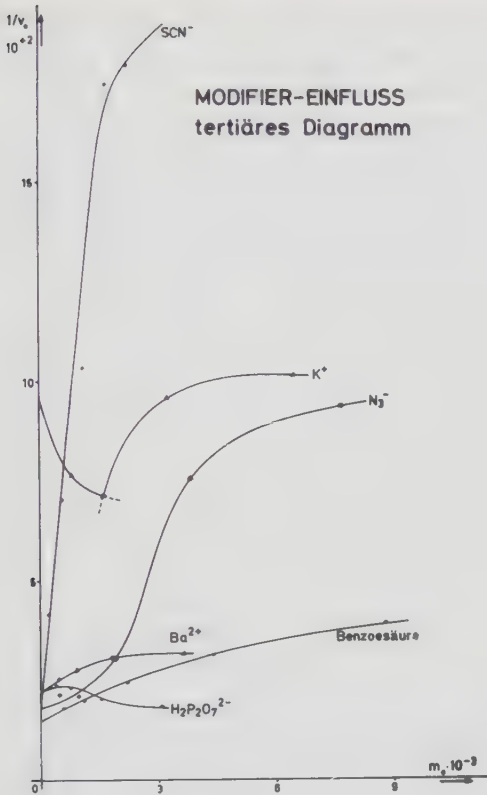
Abb. 21



+Cyhy-Synthese: doppelreziprokes Diagramm; Änderung der
K- und V-Werte mit steigender Modifier-
konzentration als weiteres Kriterium der Inhibitionsart:

Modifier	$m_0 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$	$K \cdot 10^{-2} \text{ mol/l}$	$V \cdot 10^{-4} \text{ mol/l} \cdot \text{min}$
C_6H_5COOH	0,55	5,05	30,94
	1,10	6,30	20,24
	2,20	7,91	8,12
	4,39	9,18	1,45
	8,78	9,60	0,19
	0,48	8,86	4,31
NaN_3	0,96	9,18	2,07
	1,91	9,41	0,85
	3,82	9,66	0,11
	7,64	9,62	0,61
	0,22	9,31	1,126
	0,55	9,72	0,031
$NaSCN$	1,11	9,76	0,013
	1,66	9,78	0,002
	2,22	9,78	0,001

Abb. 22



+Cyhy-Synthese: reziprokes Diagramm zur Ermittlung der Inhibitionsart; für Rhodanid, Azid und Benzoessäure kann eine hyperbolische Hemmung angenommen werden; weitere Angaben siehe Abb. 20, 21

Hinweise.

Nach den in der Legende zu Abb. 21 angeführten K- und V-Werten beeinflussen Rhodanid, Azid und Benzoessäure hauptsächlich die Quasi-Maximalgeschwindigkeit. Bei gleichem m_0 von ca. $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l vermindert Azid den V-Wert auf ein zehntel und Rhodanid auf ein tausendstel gegenüber dem V-Wert der Benzoessäure. Für Rhodanid und

Azid kann definitionsgemäß eine noncompetitive Hemmung angenommen werden. Für Benzoessäure ist ein gemischter Hemmungstyp gegeben, da sich sowohl K als auch V ändern. Auffallend ist, daß mit zunehmendem m_0 , die Quasi-Michaeliskonstante steigt, während die Quasi-Maximalgeschwindigkeit abnimmt. Außerdem nähert sich K mit wachsendem m_0 einem Sättigungswert von ca. $9,8 \cdot 10^{-2}$ mol/l. Dies gilt auch für +Cyhy.

5 Kernsubstituenteneinfluß auf das katalytische Potential der Hydroxynitrillyase

OxL setzt eine Anzahl aliphatischer und aromatischer Aldehyde mit HCN zu D-Cyanhydrinen um^{4,5)}. Sie zeigt damit eine ausgeprägte Wirkungsspezifität. Ihre Substratspezifität ist dagegen sehr gering. Für substituierte BA'e ist zu erwarten, daß OxL gegenüber BA die größte Substratspezifität besitzt. Wird die Affinität der OxL zu den Substraten durch den Kernsubstituenten verändert, sind sterische, mesomere und induktive Effekte bei der Beurteilung des Substituenteneinflusses zu berücksichtigen. Die Wirkung der Kernsubstituenten auf das katalytische Potential der OxL ist an Hand der molekularen Aktivität, der Syntheseleistung, der asymmetrischen Konstante, der Quasi-Michaeliskonstante und der Quasi-Maximalgeschwindigkeit untersucht worden. Mit diesen Größen ist es möglich, den Substituenteneffekt von Reaktionsbeginn bis zum Reaktionsende und seine Wirkung auf Geschwindigkeiten und Gleichgewichte zu untersuchen.

Zur Prüfung des Substituenteneinflusses wurden BA'e eingesetzt, die in 2-, 3- und 4-Stellung folgende Substituenten tragen: CH_3 , CH_3O , OH, NO_2 , F, Cl und Br. Diese Auswahl ermöglicht es, eindeutig festzustellen, welche Effekte den enzymatischen Reaktionsweg ausschlaggebend beeinflussen. Von den angeführten Aldehyden ist mit 4- NO_2 -BA eine asymmetrische Synthese und die anschließende Racemisierung nur bei extrem hohen OxL-Konzentrationen beobachtet worden. Der erreichte Enddrehwert von +0,008 grd bei 436 nm nach 20 min bestätigt nur das Becker'sche Ergebnis⁴⁾, daß 4- NO_2 -BA von OxL nicht umgesetzt wird. 2-OH-BA läßt sich verhältnismäßig gut mit OxL zum D-(-)-Cyhy umsetzen, nach 5 bis 6 min tritt reproduzierbar eine Trübung der Lösung durch ausfallendes Apoenzym ein. Eine kinetische Untersuchung ist deshalb nicht möglich. Die Konzentrationsverhältnisse entsprachen ungefähr denen der

+Cyhy-Reaktion. 4-QH-BA zerstört OxL wesentlich schneller als der in 2-Stellung substituierte. Hier wurde bis zur OxL-Denaturierung ein D-(-)-Cyhy bei 436 nm gebildet. Bei 3-OH-BA steigen zwar die Enddrehwerte (positiv bei 436 nm) mit zunehmendem d_0 , die v_0 's, aufgetragen gegen d_0 , zeigen aber einen exponentiellen Abfall, statt linear zu steigen. Mit 2-Br-BA bewirkt OxL nicht die übliche hyperbolische Näherung der Enddrehwerte an einen Maximaldrehwert. Die erhaltenen Enddrehwerte nehmen dem Betrag nach linear von -0,028 bis -0,258 grd zu.

In Kapitel 3.2.3.3 ist erwähnt, daß für die kinetische Behandlung enzymatischer Systeme eine direkte Abhängigkeit zwischen v_0 und e_0 bestehen muß. Auf die Wiedergabe der v_0/d_0 -Diagramme wird verzichtet; ebenso auf die einer u_{sl}/d_0 -Auftragung und die der $1/mol_{end}$ gegen $1/d_0$ -Diagramme (vgl. auch Kap. 3.4 und 3.5). Bei allen in Tab. 2 angeführten R-BA'en ist v_0 , u_{sl} und mol_{end} im mathematisch statistischen Sinne die von d_0 abhängige Variable. Damit ist sichergestellt, daß trotz der denaturierenden Wirkung der Aldehyde auf OxL eine Kinetik mit den angegebenen R-BA'en gefahren werden kann und die OxL-Denaturierung kinetisch benachteiligt gegenüber der asymmetrischen Synthese ist.

Aus diesen drei Auftragungen erhält man die molekulare Aktivität (a_m in 1/min; entspricht der katalytischen Konstanten, vgl. Kap. 1), die Syntheseleistung (s_1 in 1/min) und die asymmetrische Konstante (a_k in mol/l). a_m ist ein Maß für die Umsetzungsgeschwindigkeit der Substrate zu Reaktionsbeginn. s_1 charakterisiert die asymmetrische Produktansammlung bis zum Reaktionsende. Je größer der Wert für beide ist, um so schneller kann OxL das D-Epimere des betreffenden Cyhy's bilden. a_k gibt einmal die OxL-Konzentration an, bei der 50 % optische Ausbeute für die angegebenen Substratkonzentrationen erreicht wird; zum anderen kann a_k nach Kapitel 3.4 als Dissoziationskonstante eines OxL·R-BA - Komplexes aufgefaßt werden und

ist somit ein Maß für die freie Standardbildungsenthalpie dieses Komplexes. Je kleiner a_k ist, um so weniger OxL wird für eine gegebene optische Reinheit des asymmetrischen Produktes benötigt. Dementsprechend nimmt mit steigendem a_k das Ausmaß der Enzym-Substrat-Komplexbildung ab.

Für die Bestimmung der Substituenteneffekte werden neben den angeführten Größen die Michaeliskonstante und die Maximalgeschwindigkeit benutzt. Nach Kapitel 3.4 kann es sich hier nur um kinetische Quasiparameter handeln. In die Quasi-Michaeliskonstante (K_1 , K_r) geht die HCN-Konzentration mit ein. Die Quasi-Maximalgeschwindigkeit (V_1 , V_r) bezieht sich auf ein d_0 von $2 \cdot 10^{-7}$ mol/l. Die K- und V-Werte wurden nach der integrierten Michaelisgleichung (35) berechnet. Die von (35) geforderte Linearität ist bei den V_1 - und K_1 -Werten mindestens für die ersten zwei Minuten nach Reaktionsbeginn gegeben und mit 0,1 % Irrtumswahrscheinlichkeit signifikant. K_1 und V_1 entsprechen damit den eigentlichen Quasiparametern. Um den Substituenteneffekt über einen längeren Zeitraum zu untersuchen, wurde mit sämtlichen α/t -Werten einer Reaktion (22 Meßwerte bis zur 6. min) V_r und K_r berechnet. Für diese Parameter gilt eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 2 bis 10 %. Sämtliche V- und K-Werte sind in Tab. 3 angegeben. V ist ein Maß für den Zerfall eines multiplen OxL-Substrat-Komplexes in freie OxL und D-Cyhy. Je größer V ist, um so schneller bildet sich das D-Cyhy. K gibt die Substratkonzentration an, für die halbmaximale Geschwindigkeit erreicht wird. Je kleiner K ist, um so weniger Substrat wird für die Sättigung der OxL benötigt und um so größer ist die Affinität der OxL zu dem betreffenden Aldehyd.

5.1 Sterische Effekte

Enzymatische Gesetze kann man mit Gesetzen der heterogenen Katalyse und Chemisorption beschreiben. Aus diesem

Substituenteneinfluß

Tab. 2

molekulare Aktivität a_m , Syntheseleistung s_l und asymmetrische Konstante a_k der OxL bei D-(±)-R-Cyhy-Synthesen:

Substituent	σ	$a_m \cdot 10^4$	$s_l \cdot 10^3$	$a_k \cdot 10^{-7}$	HCN-Konz.	BA-Konz.
H	0	10,29	20,29	0,629	0,746	0,096
4-CH ₃	-0,15	2,04	5,11	2,71	0,749	0,086
3-CH ₃	-0,07	4,34	9,91	0,605	0,745	0,086
2-CH ₃	-	1,24	3,70	5,71	0,745	0,086
4-HC ₃ O	-0,16	0,22	0,64	6,15	0,750	0,076
3-CH ₃ O	0,06	2,94	5,85	1,27	0,751	0,076
2-CH ₃ O	-	0,17	0,17	8,44	0,749	0,011
3-NO ₂	0,7	0,66	0,013	15,44	0,255	0,046
2-NO ₂	-	0,24	0,31	26,5	0,256	0,036
4-F	0,17	7,47	12,61	0,56	0,505	0,083
3-F	0,35	8,21	20,85	1,29	0,506	0,083
2-F	-	5,0	18,72	2,51	0,506	0,083
4-Cl	0,27	1,99	7,06	2,54	0,506	0,070
3-Cl	0,37	3,90	18,24	1,07	0,506	0,073
2-Cl	-	3,23	2,66	10,65	0,505	0,073
4-Br	0,26	0,75	2,43	1,82	0,255	0,027
3-Br	0,38	1,56	5,77	1,40	0,255	0,028
2-Br	-	0,37	0,44	80,8	0,255	0,028

die Daten resultieren aus Standardmessungen mit R-BA'en bei unterschiedlichen d_0 's; resultierende v_0 gegen d_0 aufgetragen; die Steigung dieser Geraden (nach Kap. 3.2.3.3 mit a_m identisch) ist ein Kriterium für den Substituenteneinfluß; ebenso s_l (Steigung im u_{sl}/d_0 -Diagramm, Kap. 3.5) und a_k (berechnet aus Steigung im $1/\text{molend}$ gegen $1/d_0$ Diagramm, Kap. 3.4); Konzentrationen und a_k sind in mol/l, a_m und s_l in 1/min angegeben; Varianzen und Korrelationen: sie sagen aus, daß im mathematisch statistischen Sinne mit weniger als 0,1 % Irrtumswahrscheinlichkeit v_0 , u_{sl} (unit) bzw. 1/molend (erreichte D-Cyhy-Konzentration) die von d_0 bzw. $1/d_0$ linear abhängige Variable ist; Ausnahmen für v_0/d_0 und u_{sl}/d_0 : bei 3-NO₂, 2-Cl, 4-Cl und 2-Br ist die Linearität mit 0,2 bis 4 % gegeben; die σ -Konstanten gab Wells²⁶⁾ an.

Grunde muß der Raumbedarf der Kernsubstituenten modifizierend auf das katalytische Potential der OxL wirken. Für die in Tab. 2 und 3 angeführten Substituenten ist die raumbeabspruchende Rangfolge in (41) angegeben. Unter der

	NO ₂ , Br	>	CH ₃ O, Cl	>	CH ₃ , F	>	H	(41)
a_m	0,7	:	2,1	:	4,7	:	10,6	
s_l	0,8	:	2,9	:	5,9	:	10,1	
a_k	24	:	5	:	2,2	:	0,6	
K_L	0,4	:	0,8	:	1	:	1,2	
V_L	0,1	:	1,1	:	0,3	:	6	

Substituenteneinfluß auf K und V

Tab. 3

Substituent	σ	Quasi-Michaelis-konstante (mol/l)		Quasi-Maximalgeschwindigkeit (mol/l·min)	
		$K_1 \cdot 10^{-1}$	K_r	$V_1 \cdot 10^{-4}$	V_r
H	0	1,169	8,59±0,17	60,455	(5,15±0,45)·10 ⁻²
4-CH ₃	-0,15	0,791	12,60±0,76	2,011	(4,48±1,70)·10 ⁻³
3-CH ₃	-0,07	1,466	11,37±1,25	77,895	(1,73±0,50)·10 ⁻²
2-CH ₃		1,101	9,88±0,27	5,790	(2,93±0,23)·10 ⁻³
3-OH	0,04	0,276	36,33±0,02	·10 ⁻⁶	(6,14±1,86)·10 ⁻⁸
3-NO ₂	0,70	0,467	21,53±0,06	0,068	(5,00±0,48)·10 ⁻⁵
2-NO ₂		0,420	23,72±1,38	3,124	(5,72±1,62)·10 ⁻³
4-CH ₃ O	-0,16	0,752	13,51±0,09	0,002	(1,08±0,45)·10 ⁻⁵
3-CH ₃ O	0,06	1,453	10,20±0,60	60,810	(2,00±0,34)·10 ⁻²
2-CH ₃ O		0,110	90,66±0,17	·2·10 ⁻⁴	(2,24±0,45)·10 ⁻⁶
4-F	0,17	0,836	11,34±0,20	1,656	(2,34±0,49)·10 ⁻³
3-F	0,35	0,862	11,95±0,09	1,681	(1,14±0,24)·10 ⁻³
2-F		0,881	12,00±0,04	0,960	(2,31±0,30)·10 ⁻⁴
4-Cl	0,27	0,752	13,58±0,14	1,640	(1,60±0,21)·10 ⁻³
3-Cl	0,37	0,742	13,66±0,10	1,348	(6,48±1,19)·10 ⁻⁴
2-Cl		0,729	13,79±0,03	0,026	(1,54±0,24)·10 ⁻⁵
4-Br	0,26	0,273	36,37±0,09	0,002	(1,24±0,38)·10 ⁻⁵
3-Br	0,38	0,295	35,07±0,28	0,378	(5,33±1,16)·10 ⁻⁴
2-Br		0,280	35,35±0,09	0,015	(2,91±0,60)·10 ⁻⁵

die Quasiparameter K_1 , K_r , V_1 und V_r wurden nach (35) aus der zunehmenden +Cyhy-Konzentration (c_t in (35)) während des enzymatischen Reaktionsablaufes berechnet; Indices für K und V: 1 bezieht sich auf den Reaktionsbeginn, r auf die ersten 6 min (vgl. Kap. 5); die σ -Konstanten gab Wells²⁶⁾

Relationsgleichung (41) sind Verhältniszahlen angegeben, um zu verdeutlichen, welchen Einfluß auf die einzelnen Größen der Raumbedarf der Substituenten ausübt. Berücksichtigt man nur die Größe der Substituenten und nicht deren Lage am Phenylkern, nimmt mit steigendem Volumen die molekulare Aktivität, die Syntheseleistung, die Quasi-Michaeliskonstante und die Quasi-Maximalgeschwindigkeit ab, die asymmetrische Konstante zu. Als Maß dient hier das arithmetische Mittel der Tabellenwerte eines Substituenten in 2-, 3- und 4-Stellung. Danach verschlechtert jeder Substituent in bezug auf BA die katalytische Eigenschaft der OxL. Mit zunehmender Substituentengröße wird die von Bernhard²⁷⁾ erwähnte komplementäre Dispersionskraft geringer. R-BA'e werden im aktiven Zentrum schwächer

gebunden als BA. Höhere d_o 's werden notwendig, um optische Ausbeuten im präparativen Maßstab zu erhalten. Tab. B2 im experimentellen Teil und die a_k 's der Tab. 2 verdeutlichen dies. Berücksichtigt man die Lage der Substituenten am Phenylkern, zieht OxL aufgrund der a_m -, s_1 - und a_k -Werte metasubstituierte BA'e ohne Ausnahme den parasubstituierten vor; orthosubstituierte werden am schlechtesten umgesetzt. Für die kinetische Quasiparameter K_1 und K_r gilt diese Aussage nicht. Bei nitro- und halogensubstituierten BA'en werden die K-Werte praktisch nicht durch die Stellung des Substituenten am Phenylkern beeinflusst. Bei methyl- und methoxysubstituierten BA'en ist die Einflußnahme unterschiedlich. Eine Bevorzugung metasubstituierter BA'e wird nur bei der Quasi-Maximalgeschwindigkeit V_1 angedeutet. Insgesamt zeigen die kinetischen Quasiparameter weder eine Bevorzugung noch eine Benachteiligung einer der drei Stellen am Phenylkern für die durch OxL katalysierte asymmetrische Synthese.

5.2 Mesomere und induktive Effekte

Die empirische Hammett-Gleichung ist in der Lage, den Substituenteneinfluß auf die Reaktionseigenschaften der Aldehydgruppe am Phenylkern halbquantitativ zu beschreiben. In ihr wird das logarithmische Verhältnis einer substituierten (R) zu einer unsubstituierten Größe (H) dem Produkt aus zwei Konstanten gleichgesetzt:

$$\lg R = \sigma \cdot \rho + \lg H \quad (42)$$

Die Konstante σ bezieht sich auf den Substituenten. Ihr Wert ist um so positiver, je stärker elektronenanziehend der Substituent ist. In erster Näherung ist σ nicht vom Reaktionstyp und vom Reaktionszentrum abhängig. Der Proportionalitätsfaktor ρ (Reaktionskonstante) wird beeinflusst von der Natur des Reaktionszentrums und den Reaktionsbedingungen. Theoretische Grundlage für die Hammett-Beziehung ist der thermodynamische Zusammenhang zwischen der freien Enthalpie und dem Logarithmus der

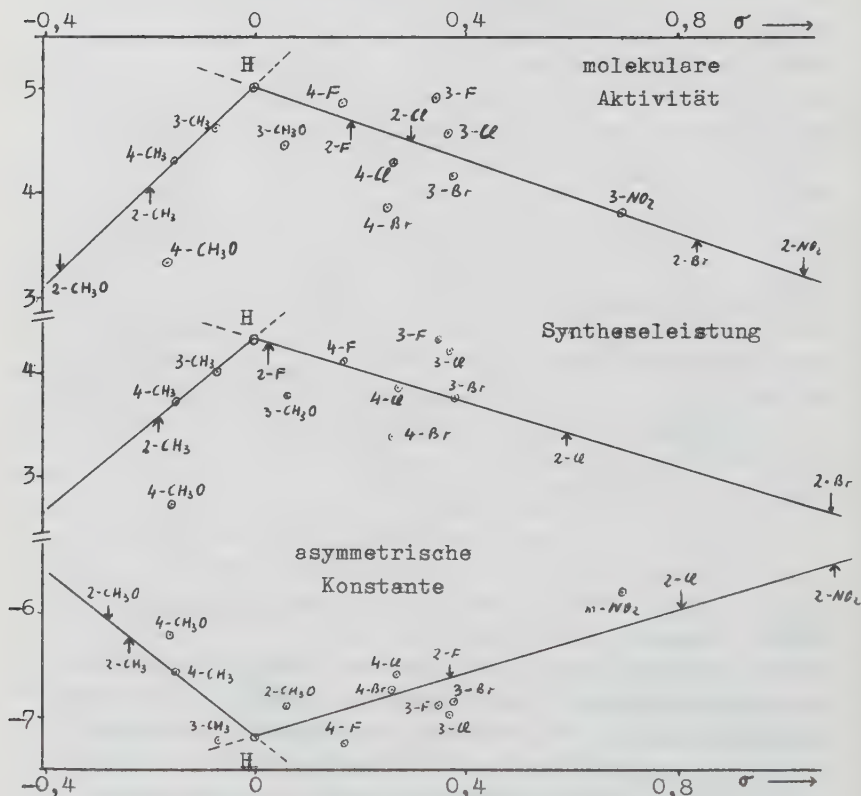
Gleichgewichts- bzw. Geschwindigkeitskonstanten (K_G):
 $\Delta G = - R \cdot T \cdot \ln K_G$. Die logarithmischen Ausdrücke in (42) geben damit die Differenz zwischen den freien Bildungsenthalpien (für Gleichgewichte) bzw. zwischen den freien Aktivierungsenthalpien (für Geschwindigkeiten) an. Nach dem zweiten Hauptsatz der Thermodynamik gilt: $\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S$. Die Gleichgewichtskonstante wird danach um so größer oder der Umsatz um so vollständiger, je positiver ΔS und je negativer ΔH sind. Analog erleichtern abnehmende ΔH 's und steigende ΔS 's den Übergang vom Grundzustand in den aktivierten Übergangszustand, wodurch die Geschwindigkeit größer wird. Substituenten wirken auf die Reaktionseigenschaften einer Verbindung, indem sie über mesomere und induktive Ladungsverteilungen die Differenzen der thermodynamischen Zustandsdaten zwischen den Edukten und Produkten bzw. zwischen dem Grundzustand und dem aktivierten Übergangszustand ändern.

Um zu prüfen, ob die Hammett-Beziehung (42) auf die durch OxL katalysierten D-Cyhy-Reaktionen anwendbar ist, sind die dekadischen Logarithmen der enzymologischen Größen gegen die von Wells²⁶⁾ in dessen Tab. 2.4 angegebenen σ 's aufgetragen worden. Für den symmetrischen Reaktionsablauf ist die lineare Beziehung zwischen den freien Enthalpien gegeben¹¹⁾. Nach den von Jaffé²⁸⁾ angegebenen ξ 's (vgl. Legende zu Abb. 25) verschiebt sich mit zunehmender elektronenanziehender Tendenz des Substituenten die Gleichgewichtslage zugunsten der D,L-Cyhy'e und die Geschwindigkeiten der D,L-Cyhy-Synthesen nehmen zu.

Eine kontinuierliche Veränderung der logarithmischen Werte geschwindigkeitsanaloger und gleichgewichtsanaloger Größen mit zunehmenden σ ist für den enzymatischen Reaktionsablauf nach Abb. 23, 24 und 25 nicht gegeben. Der Geschwindigkeit analoge Größen sind: a_m , s_1 (Abb. 23), V_1 (Abb. 24) und V_r (Abb. 25). Bei allen vier Parametern nimmt für negative σ 's die Differenz zwischen den Aktivierungsenthalpien mit wachsendem σ zu. Für positive σ 's

H A M M E T T - P L O T

Abb. 23



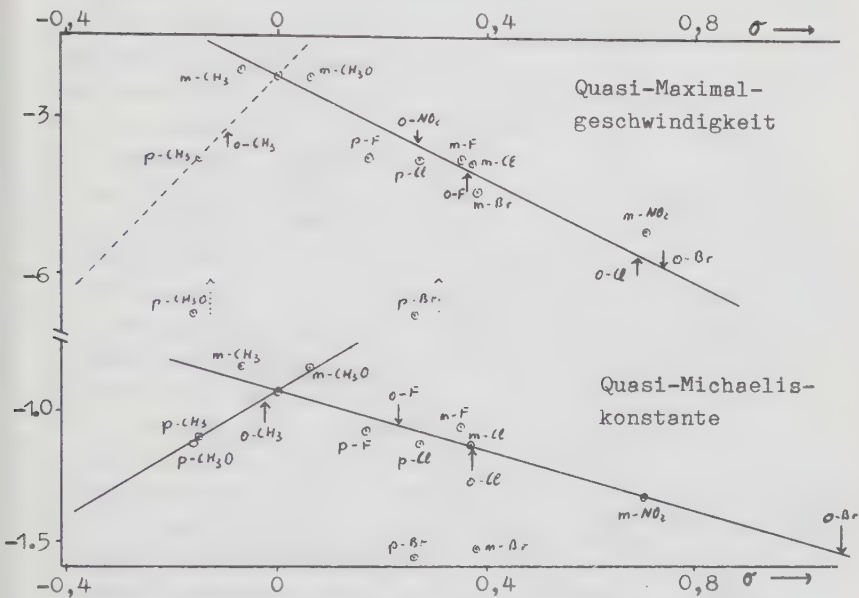
$\lg a_m = \lg s_1 = \lg a_k = f(\sigma)$: Substituenteneinfluß auf die molekulare Aktivität a_m (vgl. Kap. 3.2.3.3; a_m entspricht der katalytischen Konstante (vgl. Kap. 1)), auf die Syntheseleistung s_1 (vgl. Kap. 3.5) und auf die asymmetrische Konstante a_k (vgl. Kap. 3.4); für jeden R-BA wurden Standardmessungen mit verschiedenen OxL-Konzentrationen gefahren; die dekadischen Logarithmen der erhaltenen Werte für die Größen a_m , s_1 und a_k sind gegen die Wells'schen²⁶⁾ σ 's aufgetragen; Pfeile zeigen auf die erhaltenen Werte für 2-R-BA'e;

Reaktionskonstanten für:

	a_m	s_1	a_k
für negative σ 's:	+5,0	+4,1	-3,0
für positive σ 's:	-1,7	-1,5	+1,5

H A M M E T T - P L O T

Abb. 24

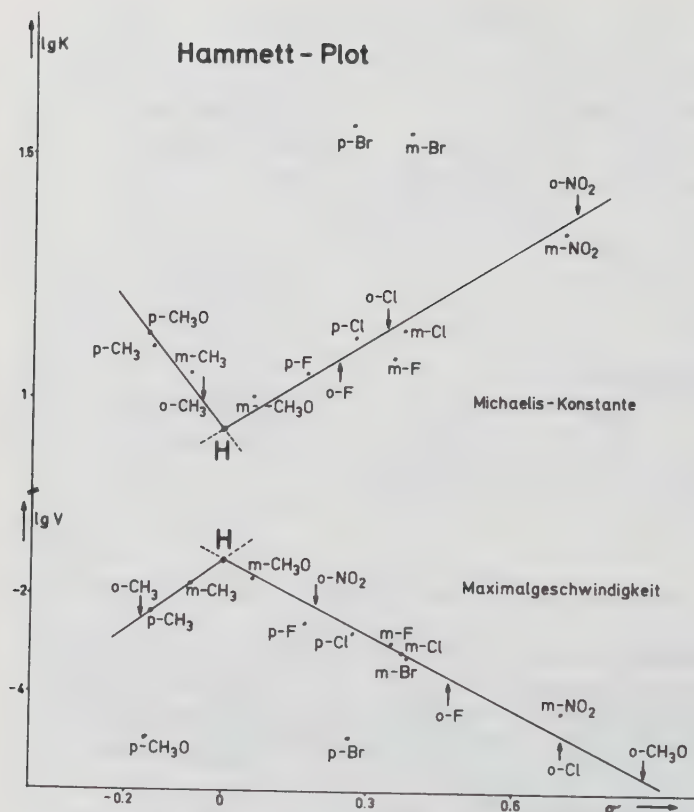


lg K₁, lg V₁ = f(σ): Substituenteneinfluß auf die Quasi-Michaeliskonstante K₁ und die Quasi-Maximalgeschwindigkeit V₁; für jeden R-BA wurden Standardmessungen bei verschiedenen d₀'s gefahren; die dekadischen Logarithmen der K- und V-Werte sind gegen die von Wells²⁶⁾ angegebenen σ's aufgetragen; Pfeile zeigen auf die erhaltenen Werte für 2-R-BA'e;

Reaktionskonstanten für:	K ₁	V ₁
für negative σ's:	+1,16	+10,0
für positive σ's:	-0,58	-4,94

fällt im Gegensatz zum symmetrischen Reaktionsablauf die Geschwindigkeit mit zunehmendem σ . Bei den gleichgewichtsanalogenen enzymkinetischen Größen s_K (Abb. 23) und K_R (Abb. 25) zeigt sich entsprechendes. Die Änderungen zwischen den Reaktionsenthalpien bei den Quasi-Michaeliskonstanten (K₁) entspricht im Gegensatz zu allen anderen Parametern der Geradenverlauf für positive σ 's der symmetrischen Reaktion. Für negative σ 's nehmen zu niedrigeren σ 's hin die logarithmischen Werte ab.

Abb. 25



$\lg K_r, \lg V_r = f(\sigma)$: aus Standardmessungen wurden nach der integrierten Michaelisgleichung die Quasi-Parameter K_r und V_r für die ersten 6 min berechnet; deren dekadische Logarithmen sind gegen die Wells'schen²⁶⁾ σ 's aufgetragen; Pfeile zeigen auf die erhaltenen Werte für 2-R-BA'e:
 §'s der symmetrischen Reaktion²⁸⁾:
 für Gleichgewichte: -1,49; für Geschwindigkeiten: +2,33
 Reaktionskonstanten für: K_r V_r
 für negative σ 's: -1,24 +7,08
 für positive σ 's: +0,60 -5,05

Den §-Werten, die mit den Quasi-Maximalgeschwindigkeiten V_l und V_r erhalten worden sind, ist folgendes zu entnehmen:
 Die absolute Größe der §'s ist deutlich höher als der §-

Betrag der symmetrischen Reaktion. Damit ist die enzymkatalysierte Produktanreicherung empfindlicher gegenüber einer Veränderung der Elektronendichte am Reaktionsort und weist eine stärkere Ladungsänderung beim Übergang in den aktivierten Komplex auf als die unkatalysierte. Für negative σ 's sind die ρ 's positiv. Hier findet, wie bei der symmetrischen Reaktion, eine Umsetzung mit nucleophilen Reagenzien statt²⁹⁾, in deren Verlauf die Elektronendichte im Reaktionszentrum durch das am elektrophilen Carbonylkohlenstoff nucleophil angreifende Cyanidion zunimmt. Für positive σ 's sind im Gegensatz zur nichtenzymatischen Reaktion die ρ 's negativ. Da eine erhöhte Elektrophilie des Carbonylkohlenstoffs eine Beschleunigung der Cyhy-Reaktion hervorruft, die asymmetrische Produktanreicherung aber durch erhöhte Nucleophilie bzw. durch eine Reaktion mit elektrophilen Partnern gefördert wird, kann der Vorzeichenwechsel der ρ 's beim Übergang zu positiven σ 's auf Wechselwirkungen zwischen OxL und den R-BA'en zurückgeführt werden. Die Kombinationsstelle für OxL in den R-BA'en verliert mit zunehmender elektronenanziehender Tendenz der Substituenten an Nucleophilie, wodurch in geringerem Ausmaß ein OxL·R-BA - Komplex gebildet werden kann, der für eine erfolgreiche asymmetrische Umsetzung notwendig ist. Aus diesem Grunde wirken die Substituenten über eine Fixierung der Substrate am Enzym auf die Reaktionskonstanten für Geschwindigkeiten ein. Für die aus a_m und s_1 erhaltenen ρ 's gilt analoges, nur ist für elektronenanziehende Substituenten die Empfindlichkeit der Reaktion gegenüber einer Veränderung der Elektronendichte am Reaktionsort geringer als bei der symmetrischen Synthese.

Eine ergänzende Auskunft über mechanistische Probleme liefern die ρ 's, die aus Gleichgewichtsanalogen Größen erhalten worden sind. Nach Kapitel 3.4 können die asymmetrischen Konstanten (a_K) als Dissoziationskonstante eines OxL·R-BA - Komplexes aufgefaßt werden. Aus dieser Sicht ist der Enzym-Substrat-Komplex mit BA der stabilste (Abb. 23).

Mit steigendem σ -Betrag des Substituenten nimmt die Fixierung der R-BA'e im aktiven Zentrum ab. Da die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes die Voraussetzung für eine asymmetrische Produktanreicherung ist, müssen bei R-BA'en höhere OxL-Konzentrationen eingesetzt werden, um die Geschwindigkeit der +Cyhy-Synthese zu erreichen. Entsprechendes ergibt sich aus den für die ersten sechs erhaltenen Quasi-Michaeliskonstanten (K_r , Abb. 25). Das aus beiden Parametern erhaltene ρ -Vorzeichen ist für elektronenliefernde Substituenten wie bei der symmetrischen Reaktion negativ. Je stärker der Substituent als Elektronendonator agiert, um so größer wird die Dissoziationskonstante. Bei der enzymatischen Umsetzung ist für positive σ 's ein positives ρ erhalten worden. In diesem Bereich wird die Dissoziation des OxL·R-BA - Komplexes durch elektronenanziehende Substituenten erhöht. Da die Umsetzungsgeschwindigkeit im Gegensatz zur symmetrischen Reaktion sinkt, muß in den R-BA'en die Kombinationsstelle für OxL an Nucleophilie verlieren. Die für den Reaktionsbeginn berechnete Quasi-Michaeliskonstante (K_1) liefert den zu a_k und K_r entgegengesetzten Verlauf im Hammett-Plot (Abb. 24). In diesem Fall ist der OxL·BA - Komplex weniger stabil als die OxL·R-BA - Komplexe. Mit zunehmendem elektronenanziehenden oder elektronenliefernden Effekt des Substituenten nimmt die Stabilität des Enzym-Substrat-Komplexes zu. Da der Substituenteneffekt auf den Phenylkern in den Aldehyden und Cyanhydrinen identisch ist, kann nicht angenommen werden, daß der Vorzeichenwechsel der ρ 's durch die Umwandlung des Substrates zum Produkt verursacht wird. Eine Zurechtrückung des Substrates im aktiven Zentrum oder eine geringe Änderung der Kettenkonformation nach erfolgter Fixierung der Aldehyde am Enzym dürfte hierfür eher verantwortlich sein. Sicher ist, daß OxL den Phenylkern bindet, einerlei ob er durch Substituenten an Nucleophilie gewinnt oder verliert. Die asymmetrische Umsetzung nimmt aber nur mit steigender Nukleophilie des Phenylkerns zu.

Substituentenkonstanten

Tab. 4

mesomerer und induktiver Beitrag zur meta- und para-Substituentenkonstante

Substituent	$\sigma_{\text{ind.}}$	$\sigma_{\text{p,mes}}$	$\sigma_{\text{m,mes}}$	σ_{para}	σ_{meta}
CH ₃	-0,05	-0,10	-0,02	-0,15	-0,07
H	0	0	0	0	0
CH ₃ O	0,23	-0,39	-0,13	-0,16	0,06
OH	0,25	-0,38	-0,13	-0,13	0,04
Br	0,45	-0,07	-0,02	0,26	0,38
Cl	0,47	-0,20	-0,07	0,27	0,37
F	0,50	-0,33	-0,11	0,17	0,35
NO ₂	0,63	0,10	0,03	0,73	0,70

die σ -induktiv Werte sind Staab's³⁰⁾ "Einführung in die theoretische organische Chemie" entnommen; die mesomeren Anteile sind auf die Wells'schen²⁶⁾ σ -Werte bezogen und nicht auf die Jaffé'schen²⁸⁾, die Staab zugrunde legte; Nach Taft³⁰⁾ gilt:

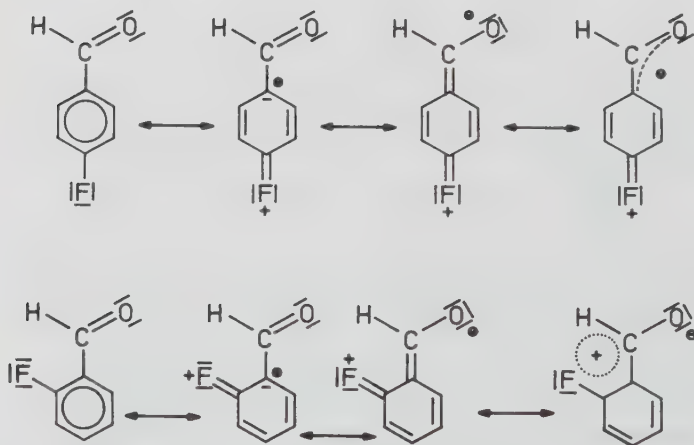
$$\sigma_{\text{-para}} = \sigma_{\text{-induktiv}} + \sigma_{\text{-mesomer}}$$

$$\sigma_{\text{-meta}} = \sigma_{\text{-induktiv}} + 0,33 \cdot \sigma_{\text{-para, mesomer}}$$

Die durch einen Substituenten eintretende intramolekulare Ladungsverschiebung wird durch mesomere und induktive Effekte beeinflusst. Nach Staab³⁰⁾ eignen sich die σ -Werte für eine quasiquantitative Abschätzung. Sie gestatten einen unmittelbaren Nachweis des mesomeren Effektes und seine Abgrenzung gegenüber dem induktiven. In para-Stellung zur reaktiven Gruppe kommt die mesomere und induktive Beeinflussung dieser Gruppe durch den Substituenten voll zur Geltung. Ein Vergleich beider Anteile in Tab. 4 und den lg V-Werten in Abb. 25 zeigt, daß die Reaktionsgeschwindigkeit um so stärker abnimmt, je größer der induktive Beitrag zur Substituentenkonstante wird.

Die Halogene besitzen annähernd den gleichen induktiven Beitrag. Ihr Einfluß auf die enzymatische Umsetzung wächst mit steigender Mesomeriefähigkeit. Diese Tendenz kommt nicht nur in para-Stellung zum Ausdruck. In Tab. 4 sind die aus dem mesomeren Anteil der para-Stellung berechneten Werte für die meta-Stellung angegeben. Da deren Mesomeriebeiträge geringer als die der para-Stellung sind, muß die abnehmende Mesomeriefähigkeit die Ursache für die fallenden Maximalgeschwindigkeiten in Abb. 25 sein. Noch

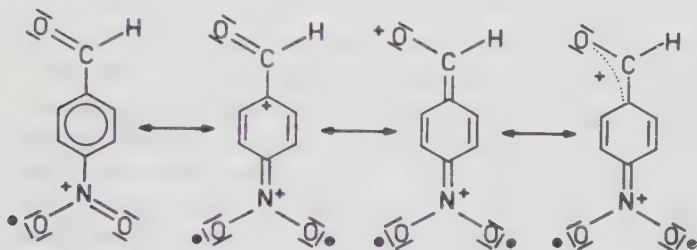
schwächer als in 3-Stellung ist danach die Mesomeriefähigkeit ortho-substituierter Halogenbenzaldehyde. Die erhaltenen Geschwindigkeiten liegen unter denen der para- und metasubstituierten BA'e. Da in 2-Stellung substituierte aus sterischen Gründen umsetzbar sein müßten und Substituenten in ortho-Stellung chinoide Strukturen bilden



können, wird wegen geringer Mesomeriefähigkeit das durch den stark ausgeprägten +I - Effekt entstehende ortho-ortho-chinoide System nicht genügend schnell zum bisubstituierten Phenylkern umgewandelt. Die Elektronenverteilung in einem solchen System, durch eine sekundär auftretende Mesomerie stabilisiert, macht es der OxL unmöglich, optisch aktive Produkte zu synthetisieren. Für Halogene in 4-Stellung wird der enzymatische Ablauf nur durch deren Mesomeriefähigkeit ermöglicht. Sie garantiert einen genügend hohen, sich schnell genug nachbildenden Anteil an umsetzungsfähigem Aldehyd.

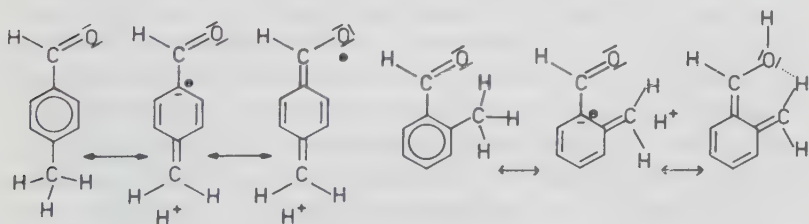
Ähnliche Verhältnisse liegen bei den Nitro-BA'en vor, die den größten induktiven Effekt aller eingesetzten Aldehyde besitzen. 4-NO₂-BA ist in der Lage, eine chinoide

Struktur bzw. ein mesomeriestabilisiertes Azidosemichinon zu bilden. Die geringe Mesomeriefreudigkeit der Nitrogruppe garantiert die Nichtumsetzbarkeit zum optisch aktiven Produkt. Bei 2-NO₂-BA verhindert die räumliche



Anordnung beider Substituenten am Phenylkern die für ein chinoides System notwendige planare Anordnung, ermöglicht aber wegen der Nichtausbildung das Eingreifen der OxL in den Reaktionsablauf. Schlechter als 2-NO₂-BA setzt sich der metasubstituierte um. Hier liegt die Nitrogruppe weiter weg vom Carbonylkohlenstoff, so daß der +I - Effekt dessen Elektrophilie für einen nucleophilen Angriff nicht so stark erhöht wie bei 2-NO₂-BA.

Methylgruppen haben in ungesättigten Verbindungen einen echten +I - Effekt. Vergleichbar mit Fluor können die Wasserstoffatome mit den Elektronen des Methylkohlenstoffs



eine quasi- σ -Bindung und zwei quasi- π -Bindungen bilden³⁰⁾. Sie sind deshalb in der Lage, einen +M - Effekt auszuüben. Diese Eigenart führt zu den angegebenen Strukturformeln und erklärt, warum 2-CH₃-BA am schlechtesten und 3-CH₃-BA sich mit OxL am besten umsetzen läßt.

Das katalytische Potential der OxL sinkt mit zunehmender Tendenz der Aldehyde, durch Substituenteneinflüsse verursachte chinoiden Strukturen zu bilden. Dadurch sinkt die Nucleophilie des Phenylkerns, die nach den §-Ergebnissen für eine erfolgreiche Umsetzung der Substrate zum asymmetrischen Produkt notwendig ist. Zeigen die Substituenten einen ausgeprägten mesomeren Effekt, ist OxL in der Lage, trotz hoher induktiver Anteile am σ des Substituenten diese Aldehyde umzusetzen. Da OxL in H₂O-gesättigtem Toluol BA zum +Cyhy umsetzt³¹⁾ und bei der symmetrischen Synthese die Geschwindigkeit in äthanolischen Lösungen zunimmt^{4,28)}, kann die steigende Inaktivität der OxL mit wachsendem induktivem Effekt der Substituenten auf den wässrig alkoholischen Acetatspuffer mit zurückgeführt werden. Er ermöglicht wegen der höheren Polarität gegenüber reinem Äthanol zwischen Lösungsmittel- und Aldehydmolekülen eine stärkere Wechselwirkung, die zu ausgeprägteren chinoiden Strukturen führt. Die komplementäre Dispersionskraft (Bernhard²⁷⁾) der OxL reicht nur für eine Fixierung der Aldehyde im aktiven Zentrum. Sie ist nicht imstande, die Mesomeriefähigkeit der Aldehyde zu beeinflussen bzw. den im Gleichgewicht vorhandenen Anteil an chinoider Struktur durch Umwandlung zum D-Cyhy zu verringern. 4-F-, 4-CH₃- und 2-NO₂-BA besitzen annähernd gleiche Aktivitäten. Die Art des Substituenteneinflusses in diesen Aldehyden auf den Phenylkern zeigt gravierende Unterschiede. Da die Hammettgleichung gut erfüllt ist, muß angenommen werden, daß auch hydrophobe Kräfte den Aldehyd während der Katalyse binden. Beide Annahmen werden durch die Modifizierungsversuche mit Cyclohexan (Kap. 4.2) und durch die Substituenteneinflüsse auf K₁ und K_r bekräftigt.

6 Kinetik der Hydroxynitrillyase

Das in dieser Arbeit wiedergegebene kinetische Verhalten der OxL bezieht sich ausschließlich auf steady state - Bedingungen, unter denen die Konzentrationen der Substrate und ihre Michaeliskonstanten wesentlich über der der OxL liegen. Die in vivo - Situation in vitro nachzuvollziehen, bei der Edukte kontinuierlich zu- und Produkte kontinuierlich abgeführt werden, was nach Cleland³²⁾ ein dynamisches steady state kennzeichnet, ist aus apparativen Gründen nicht möglich. Die unterste Anzeigengrenze des Perkin Elmar Polarimeters 141 liegt für +Cyhy-Konzentrationen bei 10^{-3} mol/l. Um reproduzierbare Ergebnisse aus den kinetischen Messungen zu erhalten, müssen Anfangskonzentrationen von mindestens 10^{-2} mol/l eingesetzt werden, so daß man in der Praxis bei verschiedenen fixen und variablen Substratkonzentrationen zu molaren Werten kommt. Dadurch droht man in einen Konzentrationsbereich zu gelangen, in dem das katalytische Potential der OxL nicht mehr oder schwer unter Kontrolle zu bringen ist. Die Ergebnisse des Kapitels 3.2.3.3 zeigen, daß unter diesen Bedingungen kinetische Untersuchungen an der OxL zu sinnvollen Ergebnissen führen, auch wenn die Konzentrationswerte der Substrate im Vergleich zu anderen Enzymen sehr hoch liegen.

Die Fluoreszenzlöschung der OxL durch BA, deren Aufhebung durch HCN^{4,21)} und die Ergebnisse des Kapitels 5.2 können auf einen ordered Mechanismus hinweisen, nach dem BA zunächst in der enzyme site gebunden wird, bevor mit HCN das +Cyhy gebildet wird. Für die Aufhellung des Mechanismus werden im folgenden die erhaltenen kinetischen Muster mit den in der Literatur beschriebenen verglichen. Die Ergebnisse sind unter den in Kapitel 1 angeführten Temperatur-, pH- und Lösungsmittelangaben erhalten worden.

6.1 Enzymatische D-(+)-Benzaldehydcyanhydrin-Spaltung

Die v_o -Abhängigkeit von der Reaktantenkonzentration gibt Gleichung (21) für Einsubstratreaktionen wieder. Spaltet man +Cyhy mit OxL in BA und HCN bei verschiedenen +Cyhy-Konzentrationen (c_o) und trägt v_o gegen c_o auf, erhält man die typisch hyperbolische Sättigungskurve (Abb. 26), deren Linearisierung nach Lineweaver/Burk gelingt (Abb. 27). Die Signifikanz der mathematisch-statistischen Aussage und die Lage der Meßpunkte zum Regressionsverlauf in Abb. 26 und 27 garantieren nicht die Richtigkeit einer Auswertung nach der von Briggs und Haldane erweiterten Michaelis-Menten-Theorie. Ist dies möglich, dann sind die in der Legende zu Abb. 27 angegebenen Parameter die Michaeliskonstante der OxL für das Substrat +Cyhy (K_{MC}) und die Maximalgeschwindigkeit der +Cyhy-Spaltung in BA und HCN für die betreffende OxL-Konzentration (V_{spalt}). K_{MC} und V_{spalt} sind nicht mit den kinetischen Werten von Seely⁶⁾ zu vergleichen, da in meinem Fall praktisch optisch reines Produkt eingesetzt wurde, während Seely racemisches Cyhy verwendete. Als Michaeliskonstante wurde ein Wert von $2,9 \cdot 10^{-4}$ mol/l angegeben. Wenn diese Angabe auch für einen Dinatriumhydrogenphosphat-zitronensäurepuffer vom pH = 5,5 gilt, so ist wegen des ca. 1000 mal höheren, von mir bestimmten K_{MC} -Wertes das L-Epimere des Cyhy's als starker Inhibitor anzusehen, so daß im Seely'schen K_M -Wert noch ein Inhibitorterm eingehen muß. Grob qualitativ verdeutlichen dies die Abb. 4 und 5.

Die von mir eingesetzten +Cyhy-Konzentrationen liegen alle unterhalb des ermittelten K_{MC} -Wertes. Nach Cleland³²⁾ sind Substratkonzentrationen um den K_M -Wert für die Bestimmung des katalytischen Potentials eines Enzyms noch gut geeignet, da die v_o/c_o -Proportionalität in diesem Konzentrationsbereich aufrechterhalten bleibt.

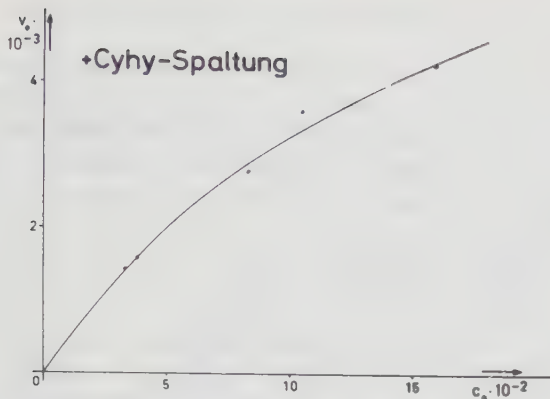


Abb. 26

+Cyhy-Spaltung: Anfangsgeschwindigkeit als Funktion der +Cyhy-Konzentration;
OxL-Konzentration: $4,19 \cdot 10^{-7}$ mol/l

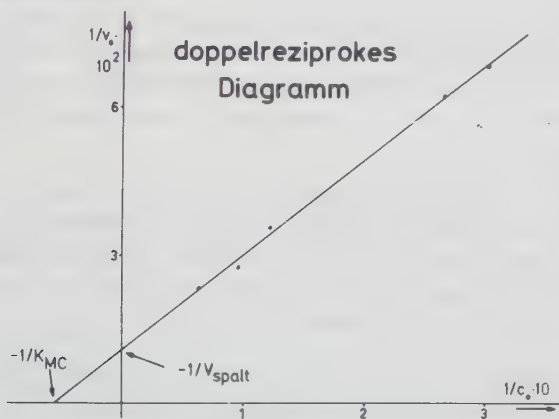


Abb. 27

+Cyhy-Spaltung: Lineweaver/Burk-Plot zur Bestimmung der kinetischen Parameter;

$(1/v_0)_n = 19,43 \cdot (1/c_0)_n + 109,22$ l·min/mol
Standardabweichung für $(1/v_0)_n = \pm 17,3$
Student'sches t = 23,94
t-min = 12,94 x)
Korrelationskoeffizient (r) = 0,9974
r-min = 0,9911 x)
x) für 0,1 % Irrtumswahrscheinlichkeit²³⁾
 $V_{spalt} = 9,16 \cdot 10^{-3}$ mol/l·min; $K_{MC} = 0,178$ mol/l

6.2 Enzymatische D-(+)-Benzaldehydcyanhydrin-Synthese

Die allgemeine Geschwindigkeitsgleichung einer Zweisubstratreaktion mit den Reaktanten A (BA) und B (HCN) gibt Gleichung (3) wieder. Überführt man sie in die reziproke Form, erhält man Gleichung (43), deren Vereinfachung (43a), hier bei konstantem b_o , der v_o -Gleichung für Einsubstratreaktionen gleicht.

$$\frac{1}{v_o} = \left[\frac{K_A \cdot K_{MB}}{V \cdot b_o} + \frac{K_{MA}}{V} \right] \cdot \frac{1}{a_o} + \frac{K_{MB}}{V \cdot b_o} + \frac{1}{V} \quad (43)$$

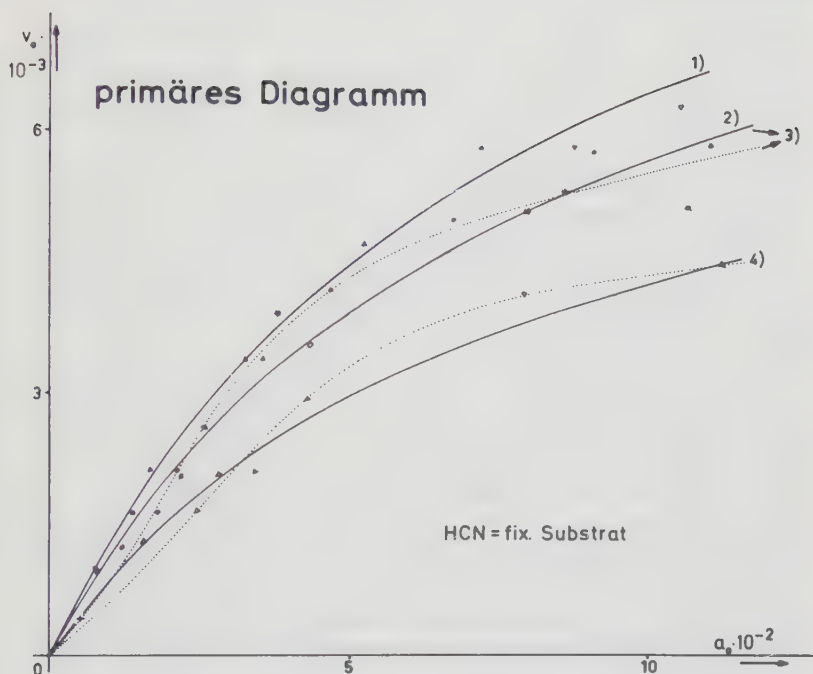
$$\frac{1}{v_o} = \text{slp} \cdot \frac{1}{a_o} + \text{int} \quad (43a)$$

Die Steigung (slp) und der Ordinatenabschnitt (int) sind bei fixem b_o Konstanten. Aus diesem Grunde erhält man für verschiedene fixe b_o -Werte bei doppelreziproker v_o/a_o -Auftragung eine Geradenschar. slp und int sind linear abhängig von b_o (oder a_o , wenn A fixes Substrat ist). Ihre Auftragung in einem sekundären Diagramm liefert über die erneut erhaltenen Steigungs- und Ordinatenausdrücke die Zahlenwerte der in Gleichung (43) angegebenen kinetischen Parameter.

Variiert man die BA-Konzentration (a_o) bei verschiedenen fixen HCN-Konzentrationen (b_o) und umgekehrt, sollten hyperbolische $v_o/s_{o,v}$ -Kurven ($s_{o,v}$: Konzentration des variablen Substrats) erhalten werden. Abb. 28 und 29 vermitteln den erhaltenen Verlauf.

Die v_o/a_o -Kurven in Abb. 28 haben im mathematisch-statistischen Sinne einen hyperbolischen Verlauf. Auffallend ist, daß für die beiden mittleren b_o 's näherungsweise das hyperbolische v_o/d_o -Muster identisch ist. Während für Kurve 2 den Meßwerten zufolge nur das Bild einer Sättigungskurve möglich ist, kann Kurve drei auch durch einen sigmoiden Verlauf wiedergegeben werden, was für Kurve 4 ebenfalls zutrifft. Der punktierte Verlauf in Abb. 28 gibt geringere als nach der Michaelis-Menten-Theorie zu erwartende Geschwindigkeiten für geringe a_o 's bei kleinen

Abb. 28



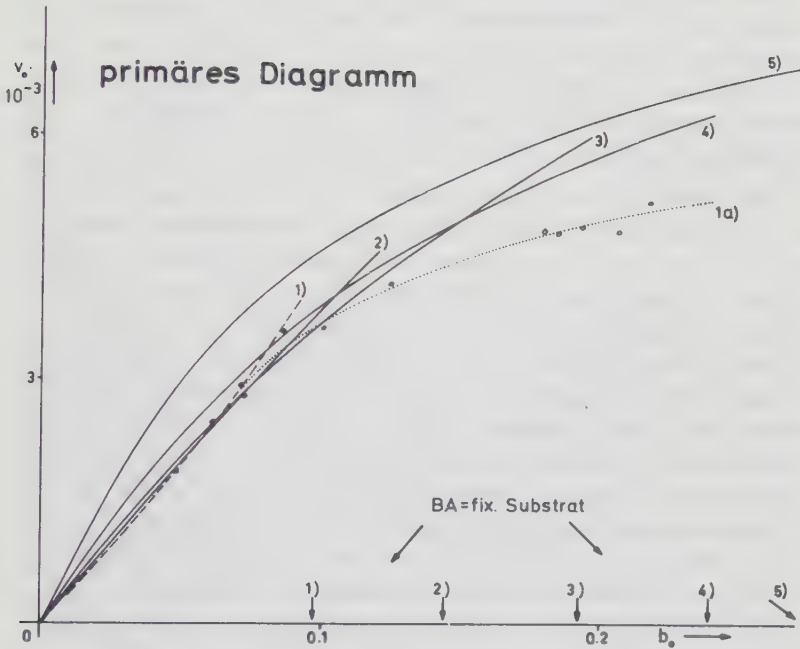
+Cyhy-Synthese: kinetische Messungen zur Prüfung des
BA-Einflusses (a_0) auf v_0 bei ver-
 schiedenen fixen HCN-Konzentrationen (b_0); a_0 ist
 nicht bis zur b_0 -Gleichheit variiert worden;
 v_0 ist in mol/l·min, a_0 in mol/l angegeben;
durchgezogene Linien: sie entstanden nach den Regres-
 sionswerten des primären, doppelreziproken Diagramms
 und sind alle mit weniger als 0,1 % Irrtumswahrschein-
 lichkeit signifikant; die Kurven 2) und 3) liegen so
 eng beieinander, daß eine getrennte Wiedergabe im
 Bild nicht möglich ist;
punktierter Verlauf: für die Kurven 3) und 4) ist
 aufgrund der Meßwerte neben dem Sättigungsverlauf
 auch ein sigmoider möglich;
Konzentrationen: OxL: $7,91 \cdot 10^{-8}$ mol/l;
 HCN für Kurve 1) = 0,629; 2) = 0,505; 3) = 0,381;
 4) = 0,256 mol/l.

fixen b_o 's wieder. Da fixe HCN-Konzentrationen einen bei niedrigem b_o auftretenden sigmoiden Verlauf durch hohe Eigenkonzentrationen zum hyperbolischen verändern können, kann angenommen werden, daß HCN als allosterischer Aktivator agiert. Bei niedrigem b_o wird ein im Verhältnis zu hoher HCN-Anteil für die Regulierung zur katalytisch günstigsten Konformation verwendet. Der übrig gebliebene HCN-Betrag verursacht schon aufgrund der v_o/b_o -Proportionalität geringere Geschwindigkeiten, als wenn das gesamte b_o für katalytische Zwecke eingesetzt werden kann. Monod, Wyman und Changeux³³⁾ veröffentlichten theoretische v_o/s_o -Kurven, die denen der Abb. 28 ähneln.

Ein primäres doppelreziprokes Diagramm mit den Werten, die zu Abb. 28 führten, liefert einen rechnerisch ermittelten Geradenschnittpunkt bei $1/v_o = 32,65$ und $1/a_o = -8,27$. Aufgrund dieser Werte wäre ein Random-Uni Bi-Mechanismus möglich. Da der Schnittpunkt der Kurven 2) und 3) in diesem Diagramm bei $1/a_o = +43$ liegt, existiert links der Ordinate kein gemeinsamer Schnittpunkt, so daß diese Aussage mehr zufällig als signifikant ist. Das Fehlen eines gemeinsamen Schnittpunktes kann nach Cleland³²⁾ auf eine uncompetitive Substrathemmung zurückzuführen sein. Danach würde der int in Gleichung (43a) rechnerisch beeinflusst durch einen Additionsterm, in den eine OxL-HCN-Inhibitionskonstante eingeht. Für diesen Fall wird der int mit dem Faktor $(1+(b_o/K_{inhib}))$ multipliziert. Läge eine uncompetitive Hemmung vor, könnte HCN mit einem OxL·BA-Komplex zu einer dead-end - Form kombinieren, die nicht zum +Cyhy und freier OxL führt. Die Geschwindigkeiten müßten abnehmen, statt sich einem Sättigungswert zu nähern.

Für fixe a_o 's gibt Abb. 29 die v_o -Beeinflussung durch variables b_o wieder. Nur für Kurve 5) ist annähernd ein Sättigungsverlauf angedeutet. Ein Sättigungswert wird aber bei keiner der eingesetzten Konzentrationen an fixem BA erreicht, obwohl hier bis zur b_o-a_o -Gleichheit gemessen worden ist. Daß eine hyperbolische Annäherung an eine

Abb. 29



+Cyhy-Synthese: kinetische Messungen zur Prüfung des HCN-Einflusses (b_0) auf v_0 bei verschiedenen fixen BA-Konzentrationen (a_0); Peile, die auf die Abszisse zeigen, geben die Konzentrationen des fixen Substrates in mol/l an; OxL-Konzentration: $7,8 \cdot 10^{-8}$ mol/l; v_0 ist in mol/l·min, b_0 in mol/l angegeben; aus Gründen der Übersicht muß auf die Wiedergabe der Meßwerte für die Kurven 2) bis 5) verzichtet werden; der abgebildete Verlauf entspricht den Regresswerten der doppelreziproken Auftragung und ist mit weniger als 0,1 % Irrtumswahrscheinlichkeit signifikant; Kurve 1) und 1a): gestrichelter Verlauf entspricht den Kurven 2) bis 5); der punktierte gibt die b_0 -Variation über den fixen a_0 -Wert hinaus wieder; die eingezeichneten Meßwerte gelten nur für diese Kurven.

Maximalgeschwindigkeit für definiertes a_0 und infinites b_0 real ist, zeigt Kurve 1a), die Fortsetzung der Kurve 1). Hier wurde bis über den doppelten Betrag an fixem a_0 die

die HCN-Konzentration variiert. Die Ursache könnte darin liegen, daß unabhängig von der Konzentration des fixen Substrates das aktive Zentrum der OxL mit BA gesättigt ist, wofür die Ergebnisse der Fluoreszenzlöschung von Pfeil und Mitarbeiter^{4,21)} sprächen. Danach würde eine neue Enzymspezies gebildet, die einen höheren Sättigungswert an variablem Substrat als die fixe Konzentration fordert.

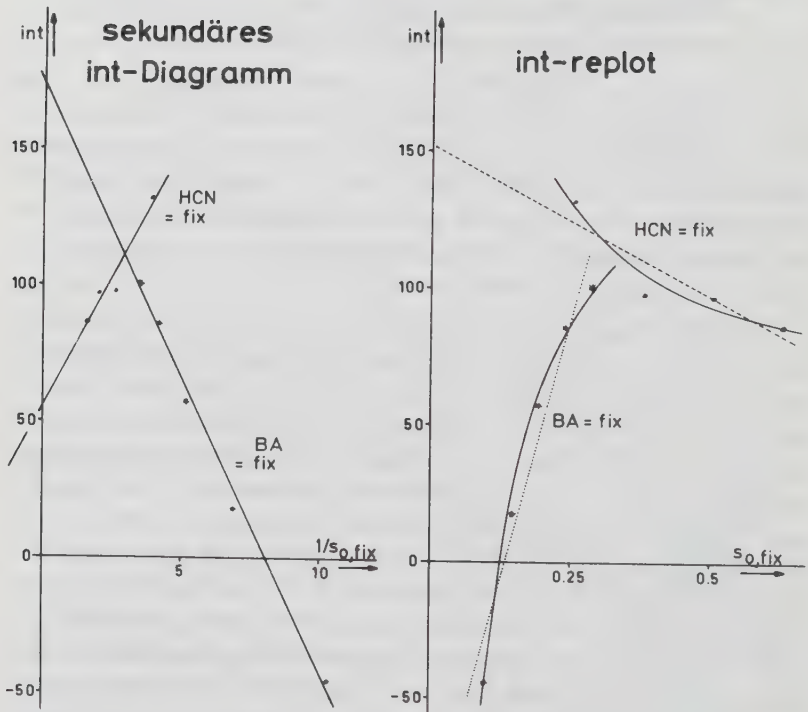
Der in Abb. 29 wiedergegebene Verlauf der fünf Kurven bis zur Konzentrationsgleichheit beider Substrate zeigt, daß für geringe fixe BA-Konzentrationen ein negativ hyperbolischer Funktionsverlauf auftritt, der mit weniger als 0,1 % Irrtumswahrscheinlichkeit signifikant ist. Kurve 1a) verdeutlicht, daß durch weitere Zugabe an variablem Substrat ein Sättigungswert erreicht wird. Dieser Verlauf entspricht einer sigmoiden Kurve. Koshland, Némethy und Filmer³⁴⁾ verglichen Sättigungskurven, die durch allosterische Beeinflussung verursacht werden und die nach dem Michaelis-Menten-Gesetz zustande kommen. Vereinfacht kann gesagt werden, daß bei niedrigen Substratkonzentrationen die v_0 's bei einem zusätzlichen regulativem Eingriff des Substrates unter denen liegen, die nach der reinen steady state Theorie zu erwarten sind. Beim Übergang in den Sättigungsverlauf, dem Wendepunkt der sigmoiden Kurve, sind die Regulierungsgeschwindigkeiten so groß, daß hier eher der Sättigungswert erreicht wird als nach der Briggs-Haldane-Theorie. Aus diesem Grunde schneiden bis zur Substratgleichheit die Kurven mit geringen fixen Konzentrationen diejenigen, die bereits eine Sättigungskurve zeigen. Da die v_0 -Ergebnisse nur Anhaltspunkte für eine regulative Beeinflussung der OxL-Aktivität geliefert haben und mit proteinchemischen Untersuchungen bisher keine OxL-Untereinheiten gefunden worden sind, wird von mir weiter versucht, mit Methoden der erweiterten Michaelis-Menten-Theorie das kinetische Verhalten der OxL zu untersuchen.

6.2.1 Beeinflussung der Sättigungsgeschwindigkeit;
Aktivität der Hydroxynitrillyase bei infiniten
Konzentrationen des variablen Substrates

Nach den Gleichungen (43) und (43a) ist der int für jeden definierten b_0 -Wert konstant. Analoges gilt, wenn BA fixes Substrat ist. Eine $\text{int}/(1/b_0)$ -Auftragung (sekundäres Diagramm) fordert einen linearen Verlauf mit positiver Steigung. Nach Abb. 30 zeigt das sekundäre Diagramm für HCN den erwarteten Verlauf. Für BA als fixes Substrat ist die Steigung negativ.

Der int eines primären doppelreziproken Diagramms ist die reziproke Geschwindigkeit für infinite Konzentrationen des variablen Substrats. Um den int zu beeinflussen, muß nach Cleland³²⁾ eine Zwischenstufe die Reaktionsgeschwindigkeit bei einem variablen Substratniveu verändern, das eine definierte Enzym-Substrat-Spezies sättigt. Variables und fixes Substrat können auf diese Weise nur mit verschiedenen Enzymformen kombinieren und diese Art ermöglicht dem fixen Substrat auch bei infiniten variablen Substratkonzentrationen eine int -Beeinflussung. Danach sind sekundäre Diagramme vereinfachte doppelreziproke Auftragungen, in denen die int 's als Maß der reziproken Sättigungsgeschwindigkeit direkt proportional den reziproken fixen Konzentrationen sind. Im vorliegenden Fall besteht für BA eine umgekehrte Proportionalität. Die größte Sättigungsgeschwindigkeit wird bei geringster fixer Substratkonzentration erreicht. Damit ist BA ein Inhibitor der asymmetrischen Synthese, was durch den replot in Abb. 30 bestätigt wird. BA hemmt hyperbolisch und verursacht das Fehlen eines gemeinsamen Schnittpunktes in einem primären doppelreziproken Diagramm. Nach Cleland³²⁾ kann die Ursache darin liegen, daß das Substrat den natürlichen Reaktionsweg hemmt und einen alternativen sucht. Die Einfachheit eines Uni Bi Mechanismus legt den Verdacht nahe, daß durch dieses Verhalten ein in vivo ablaufender random Mechanismus zu einem ordered umgewandelt wird.

Abb. 30



±Cyhy-Synthese: int-Diagramm zur Bestimmung des Einflusses der fixen Konzentration auf die Sättigungsgeschwindigkeit; $s_{0,fix}$ ist in mol/l, int in l·min/mol angegeben;

sekundäre Diagramme:

HCN: $(int)_n = +19,9 \cdot (1/b_0)_n + 55,47$

mit 5 % Irrtumswahrscheinlichkeit linear

BA: $(int)_n = -21,54 \cdot (1/s_0)_n + 172,63$

mit weniger als 0,1 % Irrtumswahrscheinlichkeit linear

replots:

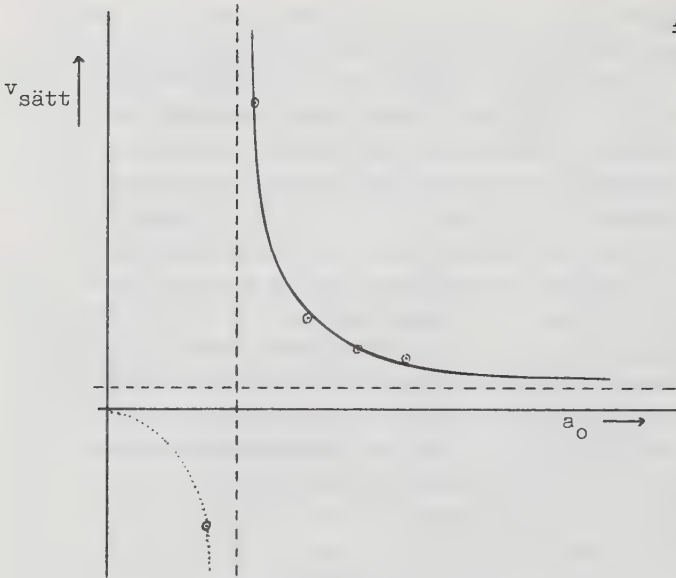
beide durchgezogenen Linien entstanden nach den Regresswerten der sekundären Diagramme; der lineare, punktierte Verlauf wäre mit einer größeren Irrtumswahrscheinlichkeit signifikant.

Bisher unberücksichtigt blieb der außerordentliche Verlauf des int-replots und des sekundären Diagramms in Abb. 30 für BA. Aufgrund der Irrtumswahrscheinlichkeiten ist der

negative int-Wert als real zu betrachten. Es fällt jedoch schwer, negative Sättigungsgeschwindigkeiten als gegeben anzunehmen. Dieser int-Wert entstand aus Kurve 1 in Abb. 29. Ihr Verlauf zeigt eine konkave statt der üblichen konvexen Krümmung, wodurch das umgekehrte Vorzeichen durch eine mathematische Operation entsteht. Nach der Geradengleichung in der Legende zu Abb. 30 fordert die negative Steigung für reziproke a_0 's, die größer 8,02 sind, bzw. für BA-Konzentrationen, deren Wert kleiner 0,125 mol/l ist, negative int's und damit negative Sättigungsgeschwindigkeiten. Im mathematischen Sinne ist die für den enzymatischen Reaktionsablauf tatsächlich zutreffende Funktion für den a_0 -Wert von 0,125 mol/l nicht erklärt. Trägt man $1/\text{int}$, also die Sättigungsgeschwindigkeit, gegen a_0 , die fixe Substratkonzentration, auf, erhält man einen Funktionsverlauf, der durch eine Unstetigkeitsstelle bzw. eine Asymptote getrennt wird (Abb. 31).

Im Normalfall wird die Ordinate im replot vom zutreffenden Funktionsverlauf im positiven Bereich geschnitten. Der klassische Geschwindigkeits-Konzentrations-Verlauf, wie er z. B. vom Michaelis-Menten-Gesetz beschrieben wird, schneidet den Koordinatenursprung. Dixon, Webb²²⁾ zeigte, daß eine solche Sättigungskurve Teil einer rechtwinkligen Hyperbel ist. Der Abstand zwischen der senkrechten Asymptote und der v_0 -Ordinate ist mit dem Betrag der Michaeliskonstanten und der Abstand zwischen der waagrechten Asymptote und der s_0 -Abszisse ist mit dem Betrag der Maximalgeschwindigkeit identisch. Im vorliegenden int-Fall entspricht dem Vorzeichenwechsel im sekundären Diagramm ein Übergang von einer konvexen zu einer konkaven Krümmung im primären Diagramm (Abb. 29, 30). Der konkave Verlauf hat eine konvexe Fortführung, während der von Anfang an konvexe die bekannte Annäherung an den Sättigungswert zeigt. Die Unstetigkeitsstelle bei 0,125 mol BA gibt die senkrechte Asymptote für den $(v_{\text{sätt}}/a_0)$ -Verlauf an, so daß man von

Abb. 31



+Cyhy-Synthese: Sättigungsgeschwindigkeit ($v_{\text{sätt}}$) als Funktion der fixen BA-Konzentration; dient dem Hinweis auf die Unstetigkeitsstelle; aus Mangel an Meßwerten ist eine exakte Wiedergabe nicht möglich; die Werte sind Abb. 30 entnommen, die waagrechte Asymptote dem BA-slp-replot in Abb. 32.

einer Verschiebung des kinetischen Musters in Richtung positiver Abszisse und negativer Ordinate sprechen kann. Diese Verschiebung erlaubt nur ab bestimmten Konzentrationen, hier ab der angegebenen des BA's, ein "normales" kinetisches Verhalten. Vorher müßte BA die OxL in einer Art beeinflussen, wie sie z. B. von allosterischen Effekten beschrieben wird. Die Kurven 1) und 1a) in Abb. 29 stärkt diese Annahme. Bei negativen int-Werten bzw. konkavem Verlauf im Geschwindigkeits-variable Substratkonzentrations-Verlauf (Abb. 29) können demzufolge second site Effekte vorherrschen, während bei positiven int-Werten genügend Substrat vorhanden ist, um ein hyperbolisch kinetisches Verhalten zu zeigen. Der Schnittpunkt der int/a_o -Kurve in Abb. 30 mit der Abszisse könnte damit den Konzentrationswert, der für eine volle

allosterische Beeinflussung benötigt wird, oder analog der Michaeliskonstanten eine allosterische Konstante liefern. Ob allosterische Effekte tatsächlich auftreten, kann alleine mit kinetischen Ergebnissen nicht gefolgert werden. Eine parabolische Abhängigkeit aufgrund Kurve 1) in Abb. 29 ist wegen ihrer Fortführung nicht gegeben. In dieser Abbildung wird gezeigt, daß hohe a_0 's den bei niedrigen Werten auftretenden sigmoiden Verlauf in einen hyperbolischen umkehren können. Danach wäre BA als Aktivator anzusehen. Dem sekundären int-Diagramm, dem BA-int-replot in Abb. 30 und der $v_{\text{sätt}}$ -Abhängigkeit von a_0 (Abb. 31) zufolge kann BA nur hemmend auf die Sättigungsgeschwindigkeit wirken.

Die für sekundäre Diagramme geforderte lineare int-Zunahme mit wachsender reziproker Konzentration des fixen Substrates ist für HCN gegeben. HCN ist aber nicht nur in der Lage, durch eine Reaktion mit einer OxL·BA-Spezies die Sättigungsgeschwindigkeit zu beeinflussen, sondern muß auch dem int-replot zufolge (Abb. 30) hyperbolisch aktivieren. Nach dem Incubationsergebnis (Abb. 6) und dem primären Diagramm (Abb. 28) ist eine regulierende Wirkung der HCN auf die Enzymkonformation möglich, so daß eine vom BA-Einfluß unabhängige Aktivierung eher wahrscheinlich ist als nur eine aufhebende Wirkung des BA-Einflusses. Aktiviert HCN stärker als BA hemmt, könnte die Umwandlung eines sigmoiden Verlaufs in einen hyperbolischen darauf zurückgeführt werden. Damit würde ein scheinbar allosterischer Effekt durch die konträre Eigenschaft beider Substrate auf den enzymatischen Reaktionsablauf erreicht.

6.2.2 Beeinflussung der Kombinationsgeschwindigkeit; Veränderung der Enzymaktivität durch Kombination einer Enzymspezies mit variablem und fixem Substrat

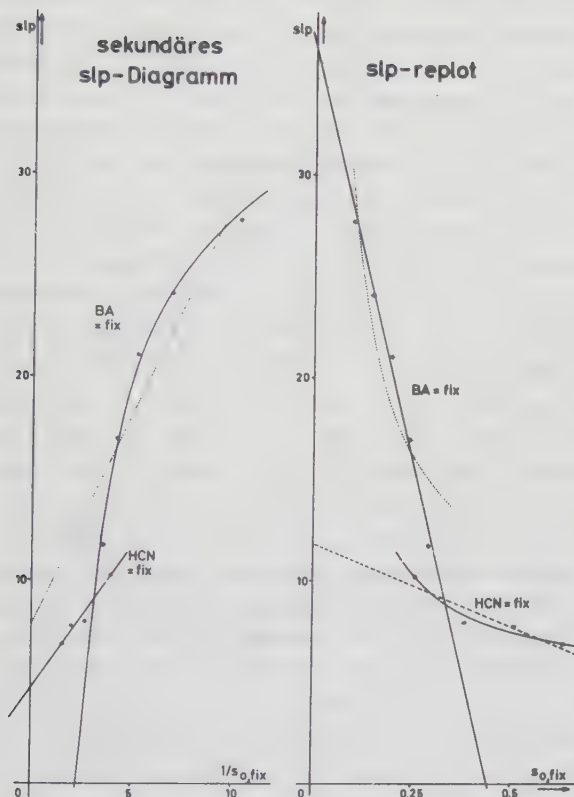
Wie der int so ist auch die Geradensteigung (slp) in Gleichung (43) für einen definierten Konzentrationswert an fixem Substrat konstant, so daß eine sekundäre Auftragung

eine Gerade mit positiver Steigung wiedergibt. Abb. 32 zeigt die kinetische Muster in bekannter Art nur für HCN. Das sekundäre slp-Diagramm mit BA als fixem Substrat wird durch einen hyperbolischen Verlauf wiedergegeben, der die Abszisse schneidet und nicht die Ordinate, wie es ein Sequenzmechanismus fordert.

Die reziproke Steigung in einem primären doppelreziproken Diagramm hat die Dimension einer Geschwindigkeitskonstanten 1. Ordnung. Für sehr geringe Substratkonzentrationen kann im vereinfachten Fall in Gleichung (21) der s_0 -Additionsterm im Nenner vernachlässigt werden, so daß die Geschwindigkeit direkt proportional s_0 ist mit dem Proportionalitätsfaktor V/K_M . Aus diesem Grunde muß nach Cleland³²⁾ ein Substrat Sa, daß mit einer Enzymspezies E' reversibel zu einem E'·Sa-Komplex reagiert und sich selbst auf niedrigstem Konzentrationsniveau befindet, möglichst viel E' und wenig E'·Sa vorfinden, um eine optimale Kombination zu erreichen. V hängt von der Enzymkonzentration ab, so daß mit steigender Konzentration einer Enzymspezies V und damit der Proportionalitätsfaktor zunimmt. E' ist im Einsubstratfall das freie Enzym, im Mehrsubstratfall ein multipler Enzym-Substrat-Komplex. Jedes Substrat, daß den E'-Anteil in bezug auf E'·Sa vergrößert, wird die Steigung im doppelreziproken Diagramm erniedrigen bzw. die Kombinationsgeschwindigkeit erhöhen. Ein fixes Substrat, das mit E'·Sa reagiert, verringert auf diese Weise in der Reaktionsfolge den E'·Sa-Anteil in bezug auf E' und zunehmende fixe Substratkonzentrationen vermindern daher die slp's im doppelreziproken Diagramm. Ähnlich vergrößert ein Substrat, das mit freiem Enzym zu E' reagiert, E' im Hinblick auf E'·Sa, so daß die slp's im primären doppelreziproken Diagramm ebenfalls abnehmen. In beiden Fällen wird die v_{komb} erhöht und die von der fixen Konzentration abhängigen slp-Werte bewirken einen Geradenschnittpunkt.

Nach dieser Quasi- K_M -Beschreibung kombiniert HCN optimal mit einer OxL·BA-Spezies, wenn wenig OxL·BA·HCN

Abb. 32



+Cyhy-Synthese: slp-Diagramme zur Bestimmung des Einflusses der fixen Konzentration auf die Kombinationsgeschwindigkeit;

sekundäre Diagramme:

HCN: $(slp)_n = 1,4 \cdot (1/b_o)_n + 4,67$; mit 4 % Irrtumswahrscheinlichkeit linear;

BA: die durchgezogene Linie entstand nach den Regresswerten des replots;

replots:

HCN: die durchgezogene Linie entstand nach den Regresswerten des sekundären Diagramms;

BA: $(slp)_n = -82,37 \cdot (s_o)_n + 36,16$; mit weniger als 0,1 % Irrtumswahrscheinlichkeit linear.

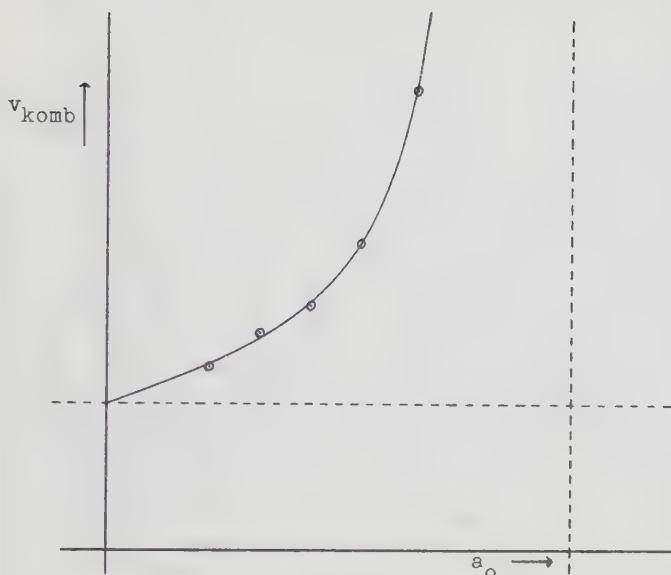
vorhanden ist und BA als zweites Substrat den $\text{OxL} \cdot \text{BA}$ -Anteil in bezug auf $\text{OxL} \cdot \text{BA} \cdot \text{HCN}$ durch Kombination mit OxL zu $\text{OxL} \cdot \text{BA}$ erhöht. Die angeführten Enzym-Substrat-Komplexe dienen nur der Anschaulichkeit. Die gegenseitige Einflußnahme beider Substrate bewirkt im Normalfall einen Geraden-schnittpunkt links der Ordinate im primären doppelreziproken Diagramm. Bei HCN als fixem Substrat kann ein solcher aufgrund des HCN-slp-replots in Abb. 32 nicht existieren, da HCN das Enzym hyperbolisch aktiviert. Dadurch ist eine lineare Anhängigkeit zwischen der Kombinationsgeschwindigkeit einer $\text{OxL} \cdot \text{BA}$ -Spezies nicht mehr gegeben. Als Resultat tritt das Fehlen eines gemeinsamen Geraden-schnittpunktes im doppelreziproken Diagramm in Erscheinung.

Ob HCN-Diagramme analog den Abb. 31 und 33 möglich sind, kann mit Bestimmtheit nicht gesagt werden. Die b_0 's für fix eingesetztes HCN liegen in einem Bereich, der keine Anhaltspunkte für eine Verschiebung des hyperbolischen Verlaufs liefert. Sekundäre int- und slp-Diagramme sind doppelreziproke Auftragungen. Ist für beide Geraden in Abb. 30 und 32 nicht nur im mathematisch statistischen Sinne die Linearität gegeben, zeigt ein Diagramm ihrer Kehrwerte eine Sättigungskurve. Danach aktiviert HCN nur die enzymatische Umsetzung und wirkt nicht regulativ auf die Konformation der OxL . Die Abhängigkeit der v_{komb} von b_0 entspräche damit den Mustern, die Sequenzmechanismen liefern.

Das sekundäre slp-Diagramm für BA in Abb. 32 zeigt eine Sättigungskurve statt einen linearen Verlauf, den ein reiner Sequenzmechanismus fordert. Außerdem schneidet im hyperbolischen Muster der $\text{slp}/(1/a_0)$ -Verlauf nicht die Ordinate sondern die Anszisse. Im replot fallen die reziproken Werte der v_{komb} mit zunehmendem b_0 . Danach wirkt BA aktivierend auf die Bildung einer $\text{OxL} \cdot \text{BA}$ -Spezies, was durch Abb. 23 verdeutlicht wird. Dieses Bild läßt auch eine parabolische Zunahme der v_{komb} zu.

Reagierte BA als fixes Substrat in einem Sequenzmecha-

Abb. 33



+Cyhy-Synthese: Kombinationsgeschwindigkeit (v_{komb}) als Funktion der fixen BA-Konzentration; dient dem Hinweis der Rangordnung der Substrate; waagrechte und senkrechte Strichlinie sind dem Ordinaten- und Abszissenwert des slp-replots entnommen.

nismus mit einer $\text{OxL} \cdot \text{HCN}$ -Spezies und verminderte deren Anteil in bezug auf freies Enzym durch Umwandlung zu einer $\text{OxL} \cdot \text{BA} \cdot \text{HCN}$ -Spezies, würde auf diese Weise das Gleichgewicht zwischen OxL einerseits und $\text{OxL} \cdot \text{HCN}$ andererseits gestört. Der schnellere Abzug von $\text{OxL} \cdot \text{HCN}$ aus dem Gleichgewicht mit steigenden b_0 's durch eine Folgereaktion mit BA verursacht dann eine beschleunigte Neubildung der $\text{OxL} \cdot \text{HCN}$ -Spezies aus dem variablen Substrat und dem Enzym. Zum analogen Ergebnis gelangt man, wenn BA mit freier OxL zu $\text{OxL} \cdot \text{BA}$ und diese Spezies mit HCN weiter zu einem multiplen Komplex reagiert, der zu freiem Enzym und Produkt zerfällt. Die Aktivierung des BA's beginnt nach Abb. 33 nicht bei einer v_{komb} von Null, sondern für den Fall einer parabolischen Zunahme mit steigendem a_0 beim v -Zahlenwert des Schnitt-

punktes der waagrechten Strichlinie mit der Ordinate von 0,0287 mol/l·min. Bei einer hyperbolischen Zunahme - sie dürfte aufgrund der geringen Irrtumswahrscheinlichkeit des BA-replots in Abb. 32 eher zutreffen - liegt die horizontale Asymptote unterhalb der Strichlinie in Abb. 33. Ihre Lage könnte einem v_{komb}/b_0 -Diagramm entnommen werden. Dieses Ergebnis führt zur Annahme, daß HCN als obligatorisches Substrat agiert. Erst wenn sich eine OxL·HCN-Spezies gebildet hat, kann BA eingreifen. v_{komb} ist nicht linear abhängig von a_0 . Daher muß mit steigenden BA-Konzentrationen die steady state Konzentration einer OxL-Spezies mit BA stärker zunehmen als es die klassische Proportionalität zwischen Geschwindigkeit und Konzentration fordert. Im Bereich der Möglichkeiten liegt eine regulierende Wirkung des BA's auf die OxL-Konformation. Auf diesen Einfluß dürfte die Umwandlung des sigmoiden Verlaufs in einen hyperbolischen in Abb. 29 beruhen.

7 Überlegungen zum enzymatischen Reaktionsablauf

Das pH-Optimum der OxL-Aktivität mit den Substraten BA und HCN liegt bei pH 6. Unterhalb pH 4,5 wird bevorzugt das Holoenzym durch Protonen in FAD und Apoenzym gespalten. Oberhalb pH 6,5 tritt in erster Linie Denaturierung durch Substrat ein. Möglich wäre eine Azomethinbildung zwischen der Carbonylgruppe des BA's und freien Aminogruppen des Proteinteils. Ist für die Denaturierung FAD der reaktive Teil am Enzym, könnte eine BA-Fixierung die Bindung des FAD's zum Apoenzym schwächen, wodurch die stabilisierende Wirkung der prosthetischen Gruppe auf den Proteinteil verloren ginge. Da beide Seiten der pH-Glockenkurve auf Stabilitätseinbußen zurückzuführen sind, können für den katalytischen Reaktionsweg keine Hinweise aus pH-Messungen erhalten werden.

Die Muster der Geschwindigkeits-Konzentrations-Diagramme für die +Cyhy-Synthese erlauben keine Auswertung der Kinetik nach der steady state Theorie, auch wenn dies für Teilbereiche möglich ist. Betrachtet man die Kombinationsgeschwindigkeit (v_{komb}) und die Sättigungsgeschwindigkeit ($v_{\text{sätt}}$) in Abhängigkeit von den Substratkonzentrationen, stellen sich gravierende Unterschiede heraus. HCN müßte, wenn sie nicht nur als Substrat, sondern auch als Modifier agiert, nach den int- und slp-replots aktivieren. Trägt man v_{komb} oder $v_{\text{sätt}}$ gegen b_0 auf, erhält man eine hyperbolische Abhängigkeit der v_0 von b_0 , wie es nach der steady state Theorie der Fall ist. Das aktive Zentrum der OxL wird danach nur zunehmend mit HCN gesättigt. Die Abhängigkeit der $v_{\text{sätt}}$ und v_{komb} von b_0 kann daher ausreichend mit der Geschwindigkeitsgleichung für Einsubstratreaktionen (21) beschrieben werden.

Die Abhängigkeit der v_{komb} und $v_{\text{sätt}}$ von der BA-Konzentration zeigt ein außergewöhnliches Verhalten. Für $a_0=0$ existiert ein reeller v_{komb} -Wert. Zurückgeführt werden kann dieses Phänomen auf eine obligatorische HCN-Anlagerung

an OxL zu einer OxL·HCN-Spezies, die weiter mit BA über einen multiplen Komplex zum +Cyhy und freier OxL reagiert. Eine primär notwendige Wechselwirkung zwischen OxL und HCN liefert bereits eine Kombinationsgeschwindigkeit, die von BA nur noch erhöht wird. Außerdem zeigt der hyperbolische v_{komb}/a_0 -Verlauf eine konkave, statt der konvexen Krümmung, die die steady state Theorie verlangt. Die gegenüber einem positiv hyperbolischen Verlauf geringere v_{komb} kann ein Hinweis für eine regulierende Wirkung des BA's auf die Enzymkonformation sein, da höhere BA-Konzentrationen einen bei niedrigem fixem a_0 auftretenden sigmoiden Verlauf in einen hyperbolischen umwandeln.

Der Kurvenverlauf im v_{komb}/a_0 -Diagramm kann auch auf eine scheinbare OxL-Aktivierung zurückgeführt werden, da v_{komb} nur die Kombination einer oder mehrerer Enzymspezies mit BA zahlenmäßig charakterisiert. Die ausgeprägte Affinität der OxL zum Substrat kommt in der Fluoreszenzlöschung und der äußerst starken Adsorption zum Ausdruck. Daß die mit zunehmendem a_0 gesteigerte Kombination nicht zu einer Erhöhung der Gesamtgeschwindigkeit bzw. zu einer gesteigerten optischen Ausbeute führt, bestätigen die $v_{\text{sätt}}/a_0$ -Abhängigkeit und die erreichten Enddrehwerte als Funktion der variablen und fixen Substratkonzentration. Die Sättigungsgeschwindigkeit fällt mit zunehmender BA-Konzentration. Da einerseits die Bildung einer OxL·BA-Spezies mit steigendem a_0 zunimmt, andererseits die Zerfallsgeschwindigkeit dieses Komplexes zum +Cyhy und freier OxL abnimmt, muß durch BA der enzymatische Reaktionsweg vor dem Schritt gestoppt werden, der den Zerfall zum Produkt und freiem Enzym charakterisiert.

Diese Funktion des BA's kann auch +Cyhy und Benzoesäure übernehmen. Bei sehr geringen Konzentrationen beeinflussen sie praktisch nur die Quasi-Michaeliskonstante. Sie würden daher mit den Substrat um die enzyme site konkurrieren. Bei hohen Eigenkonzentrationen ist ihr Einfluß auf das Quasi- K_M vernachlässigbar. Unter diesen Bedingungen wird

aber das Quasi-V stark herabgesetzt. Azid und Rhodanid zeigen analoges, nur ist deren Einfluß auf Quasi- K_M geringer und auf Quasi-V wesentlich stärker. Nach dem Modifiereinfluß auf V und K_M sollte die Affinität der OxL zu BA vermindert werden und OxL mit dem Modifier eine neue Enzymspezies bilden, die wesentlich langsamer zu den Reaktionsprodukten führt. Da das Quasi- K_M bei einer Einflunahme auf V sich nicht, wie es die steady state Theorie fordert, mit steigender Modifikonzentration kontinuierlich verändert, sondern auf den konstanten Wert ansteigt, der dem Quasi- K_M der nicht modifizierten Standardreaktion entspricht, muß weiter angenommen werden, daß diese Modifier und BA selbst die Affinität der OxL auf regulative Art modifizieren.

Die statistisch abgesicherte Existenz von negativen Sättigungsgeschwindigkeiten läßt ebenfalls auf ein allosterisches Verhalten der OxL schließen. Der int in einem doppelreziproken Diagramm ist vom v_o/s_o -Verlauf abhängig. Eine sigmoide Kurve, die nur bis zum Wendepunkt, dem Übergang in den Sättigungsverlauf, untersucht wird, muß einen negativen int und damit auch eine negative $v_{sätt}$ liefern. Da reziproke $v_{sätt}$'s den int's gleichen, entsprechen die erhaltenen Quasi-Parameter nicht den V- und K-Parametern der steady state Theorie. Sie sind nur kinetische Größen, mit denen gut gearbeitet werden kann. Ihre exakte Beziehung zur steady state Theorie kann mit den Ergebnissen dieser Arbeit nicht aufgestellt werden. Qualitativ läßt sie sich durch sekundäre Effekte erklären. Sie bewirken bei niedrigem a_o eine Aktivierung, bei hohem a_o eine Desaktivierung.

Die angeführten Modifier sind primär von nucleophiler Natur. Man kann daher dem Reaktionsort für die regulative Beeinflussung der OxL elektrophile Eigenschaften zuschreiben. FAD beeinflußt die Kettenkonformation der OxL entscheidend. BA löscht die verminderte Fluoreszenz des Isoalloxazinringes im FAD der OxL ganz, was durch HCN-Zugabe mindestens teilweise rückgängig gemacht werden kann. Der

Isoalloxazinring ist nach Slifkin³⁵⁾ als Chinon und Elektronenakzeptor aufzufassen. Es ist daher anzunehmen, daß das chinoid System des Isoalloxazinringes als second site fungiert. Eine charge transfere Bindung zwischen Modifizier bzw. BA und FAD wäre möglich. Dadurch würde die FAD-Apoenzym-Bindung gelockert und als Folge davon die Kettenkonformation verändert. Im Einklang damit steht die mehr als linear zunehmende v_{komb} -Abhängigkeit von a_0 , die mit zunehmender Strukturänderung eine stärkere Wechselwirkung zwischen BA und OxL ermöglicht. Mit der Veränderung der Kettenkonformation wird aber synchron dazu die katalytisch günstige Konformation negativ beeinflusst, so daß die Sättigungsgeschwindigkeiten mit zunehmender BA-Konzentration fallen müssen. Da insbesondere Phenole ausgeprägte charge transfer Verbindungen mit Flavinen eingehen³⁵⁾, sind die Versuche mit Hydroxy-BA'en am besten geeignet, um zu zeigen, daß im Extremfall eine solche Fixierung an OxL zur irreversiblen Denaturierung führt. 4-NO₂-BA kann wegen seines ausgeprägten chinoiden Charakters nicht mit der vermuteten second site reagieren. Seine Reduktion des Isoalloxazinringes zum Semichinon und die damit verbundene Abspaltung der prosthetischen Gruppe vom Apoenzym dient aber der Aussage, daß die Konformationsänderung bei der Holoenzymbildung aus FAD und Apoenzym u. a. auf einer charge transfer Bindung zwischen dem chinoiden Teil des Isoalloxazinringes und einer nucleophilen Stelle am Apoenzym beruht.

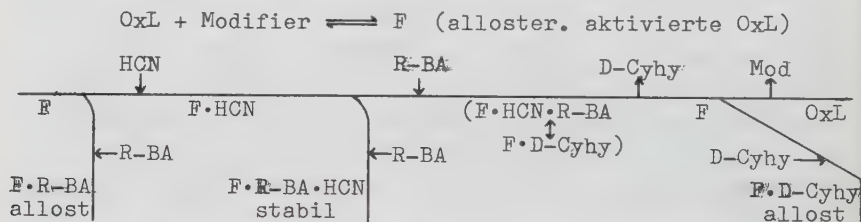
Nach den für den Reaktionsbeginn erhaltenen Quasi-Parametern K_1 und V_1 für die R-BA-Umsetzung mit OxL wird eine optimale Substratumwandlung zum Produkt erreicht, wenn eine schwache Fixierung der R-BA'e im aktiven Zentrum möglich ist. Für diese Phase ist ein elektrophiler Substratangriff auf eine nucleophile Stelle in der enzyme site gegeben. Je größer die Elektrophilie des Substrates durch den Substituenteneinfluß wird, um so mehr verschlechtert sich das katalytische Potential der OxL. Werden durch Substituenten verursachte, ausgeprägte chinoid Strukturen

gebildet, wird die Geschwindigkeit für die weitere Umsetzung zum D-Cyhy durch eine intensive Fixierung dieser R-BA'e in der enzyme site bis zum Stillstand verringert. 4-NO₂-BA ist dafür das beste Beispiel.

OxL ist aber auch in der Lage, R-BA'e mit hohem chinoidem Anteil umzusetzen. Entscheidend für die D-Cyhy-Bildung ist, daß der Substituenteneffekt einen hohen Mesomerieanteil zum Gesamteffekt des Substituenten beisteuert. Er garantiert eine lockere Fixierung im aktiven Zentrum und damit die weitere Umsetzungsfähigkeit des Enzym-Substrat-Komplexes zur freien OxL und zum Produkt. Wird der labile Chinon-Hydrochinon-Zustand durch den induktiven Anteil am Substituenteneffekt zum chinoiden System hin stabilisiert, bewirkt die erhöhte Elektrophilie des Phenylkerns die Bildung einer intensiven OxL·R-BA - Spezies. Dadurch wird der für die katalytische Umsetzung notwendige Anteil an umsetzungsfähigen Enzym-Substrat-Komplexen verringert. Wegen der verminderten OxL-Aktivität fallen die Quasi-Maximalgeschwindigkeiten und mit ihnen die optischen Ausbeuten.

Faßt man sämtliche bisher erhaltenen Ergebnisse über das Verhalten der OxL zusammen, könnte der Mechanismus der enzymkatalysierten D-Cyhy-Synthese wie folgt beschrieben werden. OxL wird über eine second site durch das Substrat R-BA in die katalytisch günstige Konformation überführt. Bei der anschließenden Substratanlagerung besteht eine obligatorische Reihenfolge, wenn eine erfolgreiche Umsetzung zum D-Cyhy stattfinden soll. OxL kombiniert zunächst mit HCN. Diese Spezies reagiert mit R-BA zu einem multiplen Enzym-Substrat-Komplex, der zu freier OxL und D-Cyhy zerfällt. Nach Abstoßen des asymmetrischen Produktes aus dem aktiven Zentrum wiederholt sich dieser Vorgang. Die Frequenz, mit der er abläuft, wird kleiner mit steigender Aldehyd- und D-Cyhy-Konzentration und der Tendenz substituierter Aldehyde, chinoiden Strukturen zu bilden. Die große Affinität der OxL zu den R-BA'en führt

bei hohen Aldehydkonzentrationen zu einer Änderung der Kettenkonformation. Sie beruht auf einer intensiven Wechselwirkung zwischen R-BA und FAD, wodurch die Bindung des FAD's zum Apoenzym gelockert wird. Bei substituierten Benzaldehyden führt die Bildung chinoider Strukturen zur intensiven Fixierung der R-BA'e in der enzyme site. Die Stabilitätszunahme dieser Enzymkomplexe vermindert die weitere Umsetzung zu D-Cyhy'en. Bei den Reaktionsprodukten ist die Neigung zur Bildung chinoider Strukturen geringer. Dadurch können die D-Cyhy'e über die second site die Kettenkonformation beeinflussen. Aufgrund dieser Erkenntnisse läßt sich das Reaktionsschema der OxL in der Cleland'schen Kurzschrift folgendermaßen angeben:



Die Bezeichnung alloster charakterisiert einen F-Komplex der OxL, bei dem die OxL-Aktivität durch einen Modifier (Mod) auf allosterische Art vermindert wird; die Bezeichnung stabil einen, bei dem die OxL-Aktivität durch die Stabilisierung einer OxL·R-BA - Spezies vermindert wird.

8 Zusammenfassung

Die symmetrische Cyanhydrinsynthese läuft in äthanolischen Acetatpuffer über eine Zwischenstufe ab, in der die Carbonylgruppe durch Protonen aktiviert ist. Anschließend greift im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt Cyanid am Carbonylkohlenstoff an. Die gefundenen Ergebnisse widerlegen die Lapworth'sche Theorie⁸⁾. Sie stehen im Einklang mit der symmetrischen Synthese aliphatischer Cyanhydrine.

OxL ist in der Lage, die Bildung des D-Epimeren des Cyhy's so stark zu beschleunigen, daß optisch reine Produkte im präparativen Maßstab erhalten werden können. Wegen der synchron ablaufenden symmetrischen Reaktion und der denaturierenden Wirkung der Aldehyde ist eine Darstellung bei 0 °C und pH = 5,5 erforderlich. Optische Reinheit kann bei +Cyhy auch durch Umkristallisieren in Bromäthan erreicht werden. Die Ausbeuten an D-Cyhy'en steigen hyperbolisch mit der eingesetzten OxL-Menge. Der Zusammenhang zwischen beiden Größen kann mit den Gesetzen der Chemosorption und heterogenen Katalyse beschrieben werden. Dieses Phänomen ermöglicht die Berechnung der spezifischen Drehung.

OxL ist ein Chromoprotein²⁰⁾ mit FAD als prosthetische Gruppe. Gezielte proteinchemische Untersuchungen sind nicht durchgeführt worden. Die erhaltenen kinetischen Ergebnisse erlauben aber, den Mechanismus in groben Zügen zu umreißen. Die durch OxL katalysierte +Cyhy-Synthese kann nach einem "allosterischen ordered Bi Uni Mechanismus" ablaufen. In einer obligatorischen Reihenfolge tritt zunächst HCN in die enzyme site ein. Anschließend wird mit BA ein multipler OxL-Substrat-Komplex gebildet, der weiter zu freier OxL und +Cyhy reagiert. BA wirkt bei niedrigen Konzentrationen regulativ aktivierend, bei hohen regulativ hemmend auf die Katalyse. Ursache ist wahrscheinlich eine BA-Adsorption an FAD, bei der eine charge transfer Bindung geknüpft wird.

B EXPERIMENTELLER TEIL

1 Darstellung von Mandel - Hydroxy - nitril - lyase

Das angeführte Verfahren geht auf Becker ⁴⁾ zurück und ist von Aschoff ¹⁹⁾ und Mehner ¹⁷⁾ modifiziert worden.

In eine 10 l Flasche werden 750 g Bittermandelkleie eingewogen, 7 l aqua dest. zugefügt und mit 6 n NH_3 der pH auf 8,5 bis 8,9 eingestellt. Nach 12 bis 14 h Schütteln zentrifugiert man 1 h bei 2.500 U/min. Der Überstand wird mit 6 n Essigsäure auf pH = 5,4 gebracht. Man läßt die Lösung über Nacht im Kühlschrank stehen und zentrifugiert erneut 1 h bei 2.500 U/min. Der gelbliche Überstand, bei den einzelnen Reinigungsschritten als Zentrifugat bezeichnet, wird in einer Ultrafiltrationszelle (Firma Amicon, Filter XM-50) bei einem maximalen N_2 - Druck von 4 kp/cm^2 eingeeengt. Die ankonzentrierte rotviolette Lösung, Amicat genannt, wird anschließend in einer möglichst langen, mit Sephadex G 100 normal gefüllten Säule (ca. 2 m) gelfiltriert. Als Elutionsmittel hat sich 0.1 n Diphosphatpuffer vom pH = 7,5 bewährt. Der Teil des Eluates, der die OxL enthält, ist schon deutlich in der Fraktionssäule an der ersten gelben Bande zu erkennen. Die im Fraktionssammler aufgefangene OxL wird durch $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - Zugabe bis zur Sättigung ausgesalzen, bei ca. 16.000 U/min abgefahren und im Kühlschrank bei ca. 4° C aufbewahrt.

Durch wiederholtes Lösen in Diphosphatpuffer und Gelfiltrieren an Sephadex wird die OxL von Begleitproteinen befreit. Die einzelnen Reinheitsstufen nach dem Amicat werden mit Roh-OxL, OxL und Rei-OxL bezeichnet. Die Benennung Sup-OxL resultiert nicht aus einer vierten Reinigung an Sephadex. Sie basiert auf dem größten Betrag an katalytisch wirksamer Menge, deren Ermittlung in Kapitel 3.3 angegeben ist. Eine graphische Wiedergabe der molekularen Aktivitäten der OxL bei den einzelnen Darstellungsschritten zeigt Abb.3 in Kapitel 3.1.

Die auf diese Art hergestellte Rei-OxL ist nach den Ergebnissen der Polyacrylamid - Disc - Elektrophorese³⁶⁾ rein. Eine ausführliche Arbeitsanleitung gibt Gerstner¹⁸⁾ an. Die Gelsäulen zeigen die drei charakteristischen Banden der einzelnen Isoenzyme¹⁹⁾. Eine vereinzelt auftretende vierte Bande hinter der am langsamsten laufenden gewährleistet aufgrund ihrer Farbintensität, daß die Verunreinigung durch Proteine bei allen verwendeten Enzymproben unter 0,5 % liegt.

Für kinetische Messungen wird die mit Ammoniumsulfat ausgesalzene OxL an kurzen Säulen, die mit Sephadex g 25 fine gefüllt sind, entsalzt. Als Elutionsmittel dient 0,01 n wässriger Acetatpuffer vom pH = 5,4. Auf die Beständigkeit der OxL in diesem Lösungsmittel wird in Kapitel 3.2.2.1. ausführlich eingegangen. Die OxL - Konzentration läßt sich aus dem molaren Extinktionskoeffizienten berechnen^{4, 19)}. Bei einem ϵ_{460} -Wert von 0,15 enthält ein ml Lösung ein mg OxL.

2. Darstellung und Reinigung der Substrate

Die als Modifizier eingesetzten Substanzen waren ausschließlich handelsübliche p.a. - Präparate. Benzaldehyd, Blausäure und die monosubstituierten Benzaldehyde sind nur gereinigt worden. Selbst dargestellt wurden lediglich die optisch aktiven Cyanhydrine.

2.1 Blausäure

Flüssige Blausäure wird mit Phosphorpentoxyd versetzt und ca. 4 h unter Rückfluß gekocht. Als Kühlmittel wird Eiswasser verwendet. Danach destilliert man über eine Kolonne ($Kp_{760} = 25,5^{\circ} \text{C}$). Eine Destillation unter N_2 ist nicht notwendig. Aufbewahrt wird die Blausäure in Borsilikatgläsern (z.B. Duran) bei -20°C ($F_p = -13,1^{\circ} \text{C}$). Unter diesen Bedingungen ist Blausäure unbeschränkt haltbar.

Beim Hantieren mit Blausäure muß in gut ziehenden Abzügen mit Handschuhen und Gasmaske gearbeitet werden.

2.2 Benzaldehyde

BA wird im Ölpumpenvakuum unter N_2 reinst destilliert ($Kp_{0.5} = 25 - 26^\circ C$) und in N_2 - Kolben aus Borsilikatglas aufgefangen. Gaschromatogramm, IR - Spektrum und Prüfung auf Peroxyde und Benzoesäure haben gezeigt, daß der gereinigte BA wasserfrei, absolut rein und einheitlich ist. Spült man bei BA - Entnahme den Kolben mit N_2 und bewahrt ihn im Kühlschrank auf, ist innerhalb der ersten zwei bis drei Wochen eine merkliche Veränderung des BA's nicht festzustellen.

Unter analogen Bedingungen wurden die folgenden Aldehyde gereinigt. Bei Sublimation oder Kurzwegdestillation ist der Schmelzpunkt (Fp) angegeben. Bei einer reinen Destillation wird der Siedepunkt (Kp) unter vermindertem Druck (p) angegeben, einerlei ob der betreffende Aldehyd unter Normaldruck und bei Zimmertemperatur fest oder flüssig ist.

Aldehyd	p Torr	Kp °C	Fp °C
BA	0,5	25-26	
4-Nitro-BA			106,5
3-Nitro-BA			56,5
2-Nitro-BA			43,5
4-Methyl-BA	1,5	50,5	
3-Methyl-BA	0,35	38,0	
2-Methyl-BA	0,5	39-40	
4-Hydroxy-BA			116,5
3-Hydroxy-BA			104,5
2-Hydroxy-BA	0,2	22-23	
4-Methoxy-BA	0,1	62,5	
3-Methoxy-BA	0,3	52,5	
2-Methoxy-BA	1,5	57,0	
4-F-BA	0,25	19,5	
3-F-BA	0,1	20,5	
2-F-BA	0,4	18,0	
4-Cl-BA	2,0	80,0	
3-Cl-BA	0,1	31,0	
2-Cl-BA	0,35	34,5	
4-Br-BA	1,0	78,0	
3-Br-BA	0,1	42,0	
2-Br-BA	0,3	45,0	

2.3 D - Benzaldehyd - cyenhydrine

In einem 2 l Dreihalskolben mit KPG - Rührer und Gasableitungsrohr (wegen HCN) wird 1 l äthanolischer Acetatpuffer (siehe unten) 0° C gekühlt. Unter Rühren werden schnell 25 ml BA (0,246 mol), 100 mg entsalztes OxL und 100 ml HCN (2,57 mol) zugesetzt. Nach 5 min ist ein Enddrehwert von zwei Grad in einer 10 cm Küvette erreicht. Aus der Reaktionslösung extrahiert man sofort nach Erreichen des Enddrehwertes das entstandene Cyanhydrin viermal mit 500 ml eiskaltem, frisch destilliertem Chloroform. Die sich unten im Schütteltrichter absetzende organische Phase wird nach der Trennung von der wässrigen mit Na₂SO₄ vorgetrocknet und anschließend am Rotavapor bei 50° C abgezogen. Zurück bleibt ein helles, fast farbloses Öl.

Ausbeute: 29 ml (0,243 mol), 98,8% bezogen auf BA

optische Ausbeute: über 90%

Drehwert des Öls (20° C): $\alpha_{436} = 100,78$; $\alpha_{589} = 45,98$

dessen spezifische Drehung: $[\alpha]_{436}^{20} = 90,2$; $[\alpha]_{589}^{20} = 41,2$

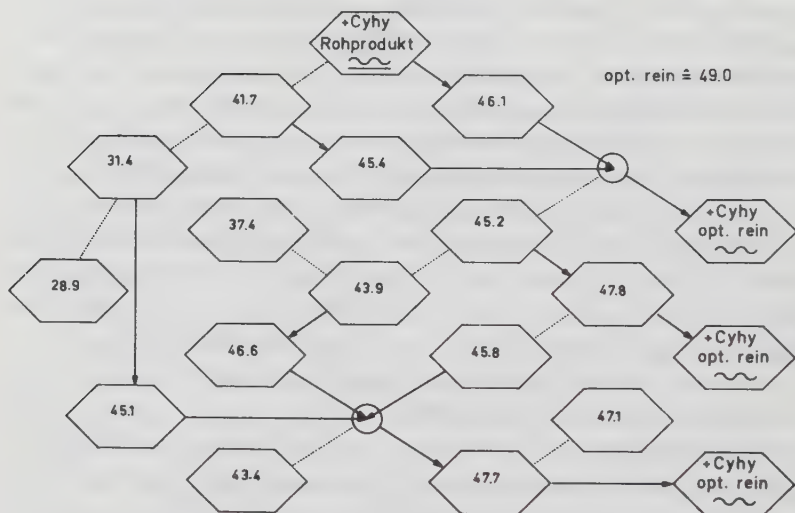
Äthanolischer Acetatpuffer: 20 ml 1 n Essigsäure und 52,5 ml 1 n Natriumacetatlösung

(bzw. 7,15 g NaOAc) werden mit O₂-freiem aqua dest. auf 750 ml gebracht. Dann gießt man absoluten Äthanol bis auf 1000 ml Gesamtvolumen hinzu. Der pH dieses Puffers beträgt 5,5. Er ist 25%ig an Äthanol und 0,075 n bezogen auf Gesamtacetat.

Umkristallisieren: Das erhaltene +Cyhy-Öl kristallisiert man aus Bromäthan bei -20° C um. Die Kristalle werden abgesaugt und mit eiskaltem Petroläther (40-50) gewaschen. In Chloroform haben die Kristalle eine spezifische Drehung von 46,1 bei 20° C und der Na-D-Linie, die Mutterlauge hat nach Abziehen des Bromäthans und Petroläthers unter den gleichen Bedingungen eine von 41,7. Durch mehrfaches Umkristallisieren der Mutterlauge und optisch nicht reiner Kristalle erreicht man den theoretischen Wert der spezifischen Drehung. Abb. B1 verdeutlicht dies.

Abb. B1

$[\alpha]_{D, CHCl_3}^{20}$ -Änderung des +Cyhy
durch Umkristallisieren in EtBr



+Cyhy - Umkristallisation: Erreichen der optischen Reinheit durch mehrmaliges Umkristallisieren in Bromäthan. In den Sechsecken ist die zutreffende spezifische Drehung für 20° C und 589 nm (Na-D-Linie) in Chloroform angegeben. Die Pfeile zeigen zum optisch reineren Produkt.

Der Schmelzpunkt für optisch reines +Cyhy liegt bei 25 - 26° C. Für die spezifische Drehung in $CHCl_3$ gilt:

$$[\alpha]_D^{20} = 49,0$$

$$[\alpha]_{436}^{20} = 111,1$$

Unter analogen Bedingungen wurden die in Tab. B1 angeführten substituierten D-Cyanhydrine hergestellt. Kristallisationsversuche an D-(+)-2-Nitro-benzaldehyd-cyanhydrin in Chloroform, Äther, Äthanol und Bromäthan zeigten, daß in sämtlichen Lösungsmitteln außer in Bromäthan eine Racemisierung des +Nitro-Cyhy's stattfand. Die Abnahme der optischen Reinheit konnte durch Zugabe eines Tropfens HCN oder Eisessig verhindert werden. Der +Cyhy-Umkristal-

Substituierte D-Cyanhydrine

Tab. B1

Darstellung	m-CH ₃ O-	o-CH ₃ -	m-CH ₃ -	p-CH ₃ -	o-NO ₂ -
mit Aldehyd	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2,223 g
ml HCN	8	8	8	8	8
mg OxL	30	30	30	30	50
ml Puffer	500	500	500	500	1000
α_D^{20}	7/0,380	20/0,262	8/0,376	10/0,448	30/0,251
spez. Drehung					
in Reak'lösg ca. 92		ca. 66	ca. 93	ca. 102	ca. 113
in Chloroform					
20° C, 436 nm	89,3	62,8	99,2	105,8	119,3
20° C, 589 nm	40,0	27,3	44,0	47,1	29,1
α_D^{20} : erreichter Enddrehwert der Lösung nach n min					

lisation analoge Versuche wurden nicht durchgeführt. Die angegebenen spezifischen Drehungen beziehen sich auf das Reaktionsprodukt nach Abziehen des mit Lösungsmittel versetzten Chloroforms. Die Schmelzpunkte der substituierten D-Cyanhydrine sind nicht bestimmt worden, da optische Reinheit nicht angenommen werden kann. Sie liegen alle über Zimmertemperatur, der des +Nitro-cyhy's über 60° C.

3. Bereitung der Lösungsmittel

3.1 O₂-freies Wasser und O₂-freier Alkohol

Aqua dest. wird bis zum kurzen Sieden im Kolben mit N₂-Aufsatz erhitzt. Währenddessen und beim anschließenden Abkühlen leitet man N₂ reinst durch die Flüssigkeit. Ist deren Temperatur unter Zimmertemperatur gesunken, wird der Kolben verschlossen. Das O₂- und CO₂-freie Wasser entnimmt man dem Gefäß je nach Bedarf durch N₂-Überdruck.

O₂-freien Alkohol stellt man durch Destillation unter N₂ reinst her. Die Kolben werden mit N₂-Aufsätzen versehen, um eine Entnahme durch N₂-Überdruck zu ermöglichen. Der Alkohol wurde nicht absolutiert; verwendet worden ist ausschließlich konstant siedender p.a. Äthanol.

3.2 Puffer

Sämtliche pH - Werte sind mit vorher geeichten pH - Metern

durch die Glaselektrode bestimmt worden.

Diphosphat - Puffer: 44,6 g $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ und 99 ml 1 n HCL
werden mit aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt. Der Puffer ist 0,1 n bezogen auf Diphosphat.

Acetatpuffer: Die Normalität der wässrigen und alkoholischen Acetatpuffer bezieht sich ausschließlich auf die eingesetzte Menge an Essigsäure und nicht auf Gesamtacetat. Für den wässrigen Puffer bei der Enzymentsalzung reicht normales aqua dest.. Puffer für kinetische Messungen müssen unbedingt mit O_2 -freiem aqua dest. bereit~~et~~ werden.

Äthanolischer Acetatpuffer wurde wie folgt hergestellt (bei wässrigem ist analog vorgegangen worden): Mit O_2 - und CO_2 -freiem aqua dest. bereitete 0,1 n Essigsäure wird mit dem gleichen Volumen konstant siedenden O_2 -freien Alkohols versetzt. Anschließend setzt man Natriumacetat zu, bis das pH - Meter den erforderlichen pH anzeigt. Die durch den Alkohol e~~nt~~retende Volumenkontraktion wird nicht ganz durch die nachträgliche Natriumacetatzugabe aufgehoben. Aus diesem Grunde ist der Puffer nicht exakt 0,05 n und wegen des eingesetzten konstant siedenden Alkohols auch nicht 50 %ig an Äthanol. Außerdem zeigt die Glaselektrode infolge des Alkohols nach Bates, Paabo, Robinson³⁷⁾ um ca. 0,2 Einheiten zu hohe pH - Werte an. Der 50 %ige äthanolische 0,05 n Standard - Acetatpuffer vom pH = 5,4 ist danach ca. 48 %ig an Äthanol, ca. 0,051 n und hat einen pH von ca. 5,2. Diese Korrekturen sind im allgemeinen Teil dieser Arbeit nicht berücksichtigt worden, es sei denn, es wird ausdrücklich darauf hingewiesen.

4. Durchführung kinetischer Messungen

4.1 Standardmessungen

Unter N_2 - reinst wird ein 10 ml Meßkolben mit Puffer nicht ganz gefüllt. Dann gibt man mit einer Mikrospritze 0,1 ml gereinigten BA und mit einer Mikropipette 0,1 ml CxL - Lösung der nach dem Extinktionskoeffizienten berechneten Konzentration von 1 mg OxL pro ml Lösung hinzu. Nach dem Auffüllen mit alkoholischen Puffer bis zur 10 ml - Marke werden mit einer Ganzglas - Tuberkulinspritze 0,3 ml reine HCN zugefügt, 5 s kräftig geschüttelt und eine Stopuhr in Gang gesetzt. Nach weiteren 5 bis 10 s Schütteln überführt man die Reaktionslösung mit einer Spritze in eine Polarimeterküvette und beginnt den Drehwert in Abhängigkeit von der Zeit zu verfolgen. Bei zügiger Arbeitsweise kann 45 s nach der Zeitnahme der erste reelle Meßwert registriert werden.

Als Lösungsmittel wird 50 %iger äthanolischer, 0,05 n Essigsäure - Acetatpuffer vom pH = 5,4 verwendet. Die Reaktionstemperatur beträgt 20 °C. Die Drehwerte sind am Perkin Elmar Polarimeter 141 bei 436 nm gemessen worden. Extinktionsänderungen wurden am Cary 15 verfolgt. Vom Zufügen der Blausäure bis zum Justieren der Küvette im Polarimeter muß aus Gründen der Sicherheit und Schelligkeit mit Gasmaskе gearbeitet werden.

Bei substituierten Aldehyden geht man analog vor. Sind sie unter Normalbedingungen fest, werden sie im alkoholischen Acetatpuffer gelöst. Aus meßtechnischen Gründen sind die Konzentrationen variiert worden. Tab. 2 in Kap. 5.1 des allgemeinen Teils gibt die Substratkonzentrationen an. Die OxL - Konzentrationen (d_0) sollen größer als die oben angegebene sein. Standardmessungen, die der Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit von d_0 und der Berechnung der spezifischen Drehung dienen, er-

fordern höhere d_0 's schon in der einzusetzenden OxL - Lösung, da sich bei hohen ml - Zugaben das Alkohol/Wasser-verhältnis zu stark verändert. Messungen für die pH - und Temperatur - Aktivität verlangen eine Variation des pH's bzw. der Temperatur. Bei Untersuchungen des Modifiereinflusses wird die im Puffer gelöste Substanz vor dem Auffüllen auf die 10 ml - Marke zugegeben. Bei der Incubation versetzt man eine OxL - Lösung von 5 bis 10 mg/ml mit der Wirksubstanz und stellt im wässrigen Acetatpuffer auf 1 mg/ml ein.

4.2 Substratvariation

Unter N_2 - reinst wird das variable Substrat in einen 10 ml Meßkolben eingewogen. Bei HCN muß aus Gründen der Flüchtigkeit der Kolben mit alkoholischem Acetatpuffer nicht ganz gefüllt werden; bei BA wird nach dem Wiegen in analoger Art Puffer zugefügt. Anschließend gibt man mit einer Mikropipette 0,1 ml OxL - Lösung der Konzentration 1 mg/ml hinzu, füllt bis zur 10 ml - Marke mit Puffer auf und fügt die entsprechende Menge fixes Substrat mit einer Mikrospritze hinzu. Danach wird geschüttelt, die Zeit genommen, nochmals geschüttelt und in die Küvette überführt. Die allgemeinen Bedingungen sind bei den Standardmessungen angegeben. Beim Einwiegen des variablen Substrates dürfen maximal drei Proben genommen werden. Ist mit ihnen die Kinetik gefahren, sollen frische Proben eingewogen werden. Aufgrund der geringen Mengen bewirken die Autoxydation des BA's bzw. die Zersetzung der HCN nicht reproduzierbare Ergebnisse.

5 Mathematische Auswertungen

Sämtliche Werte dieser Arbeit sind mit Hilfe des TR4(1) MV19 - Computer in Fortransprache berechnet worden. Auf eine Wiedergabe der selbst aufgestellten Programme und der

Rechenprotokolle ist aus Platzgründen verzichtet worden. Die wesentlichen Ergebnisse enthält der allgemeine Teil. Dort befinden sich auch die theoretischen Grundlagen, nach denen die Meßergebnisse ausgewertet worden sind. In diesem Kapitel wird näher auf die Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeit und der spezifischen Drehung substituierter BA'e eingegangen. Weiter ist angeführt, welche mathematisch statistischen Methoden eingesetzt worden sind.

5.1 Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeit

Bei chemischen Reaktionen zeigt die Produktzunahme bzw. die Abnahme der Edukte mit fortschreitender Reaktionsdauer einen exponentiellen Verlauf¹³⁾. Näherungsweise kann angenommen werden, daß unmittelbar nach Reaktionsstart der Funktionsverlauf linear ist. Bestimmt man die Geschwindigkeit nach der Differenzenmethode (Gleichung (1) im allgemeinen Teil) und trägt v gegen die Zeitdifferenzen Δt auf, kann durch Extrapolieren v_0 , die Geschwindigkeit zum Zeitpunkt $t = 0$, berechnet werden. In meinem Fall ist eine Regressionsgerade durch die ersten vier $v/\Delta t$ - Wertepaare gelegt worden. Dieser Vorgang wurde mit den ersten 5, den ersten 6, 7, ..., 20, 21 Wertepaaren wiederholt und die Varianz aller Geraden notiert. Über die Regressionsgerade mit der geringsten Varianz ist durch Extrapolieren v_0 bestimmt worden. Aufgrund aller Berechnungen ist innerhalb der ersten drei bis vier Minuten ein linearer $v/\Delta t$ - Verlauf gegeben.

5.2 Spezifische Drehung substituierter D - Benzaldehyd - cyanhydrine

Die Berechnung der spezifischen Drehung substituierter D - Cyhy'e erfolgte nach der in Kap. 3.4 des allgemeinen Teils angeführten Methode. Danach benötigt man die Geschwindigkeitskonstante der R - Cyhy - Synthese und die

Minimalwerte der spezifischen Drehung

Tab. 32

substituierter D - Benzaldehyd - cyanhydrine

theoretischer Wert für das unsubstituierte Cyhy: 75,56;
nach Kap. 5.2 ermittelter Minimalwert: 69,5 bei 436 nm;
sämtliche Angaben gelten für 20 °C und 50 %igen äthano-
lischen, 0,05 n Essigsäure - Acetatpuffer;

subst. D-Cyhy	spezif. Drehung	bei nm	subst. D-Cyhy	spezif. Drehung	bei nm
4-CH ₃	66,1	436	4-F	36,3	546
3-CH ₃	66,7	436	3-F	33,7	546
2-CH ₃	58,3	436	2-F	25,3	546
4-CH ₃ O	35,0	546	4-Cl	46,6	436
3-CH ₃ O	71,2	436	3-Cl	33,1	546
2-CH ₃ O	-98,6	546	2-Cl	-23,7	436
3-OH	33,1	546	4-Br	31,3	436
3-NO ₂	46,8	436	3-Br	65,0	436
2-NO ₂	291,0	436	2-Br	-43,5	436

Dissoziationskonstante für den Zerfall des R - Cyhy's in R - BA und HOH der symmetrischen Reaktion im verwendeten Lösungsmittel. Diese Konstanten sind nicht bestimmt worden. Trotzdem wurde versucht, über die Hammett - Gleichung mit den Wells'schen Substituentenkonstanten²⁶⁾ und den Jaffé'schen Reaktionskonstanten²⁸⁾ einen Wert für die thermodynamische und kinetische Größe zu erhalten (vgl. Kap. 5.2 des allgemeinen Teils). Aufgrund der erhaltenen Hammett - Plots (Abb. 23) ist eine Berechnung auf diese Art nicht möglich. Außerdem existieren für Substituenten in ortho - Stellung keine sigma - Werte. Angegeben werden können nur Mindestwerte für die spezifische Drehung.

Nimmt man an, daß die eingesetzte Aldehydkonzentration der der D - Cyhy'e am Reaktionsende gleicht, erhält man die Konzentration in g/100 ml, die für die Berechnung der spezifischen Drehung benötigt wird. Aus einem (1/α_{end}) gegen (1/ml Oxl) - Diagramm läßt sich der Maximalwert des für eine definierte Konzentration zutreffenden Drehwinkels bestimmen. Mit diesen beiden Größen erhält man nach Gleichung (37) des allgemeinen Teils einen Minimalwert für

die spezifische Drehung, der schon aus thermodynamischen Gründen über dem angegebenen liegen muß. Die ermittelten Werte gibt Tab. B2 an.

5.3 Fehler, Varianz und Korrelation

Eine Fehlerfortpflanzung von Beginn der Probenentnahme bis zu den über Geschwindigkeiten erhaltenen Ergebnissen wurde nicht durchgeführt. Die Standardabweichungen der Ordinatenwerte in einem x/y - Diagramm ($y = v_o, m_a, u_{sl}$, etc.; $x = a_o, b_o, d_o$, etc.) beziehen sich jeweils auf die zu untersuchenden Wertepaare. In solchen Fällen liegen die Abweichungen gegenüber den Regresswerten meistens unter der Zweiprozentgrenze. Die größten Fehler entstehen durch die eingesetzten Enzymmengen, da prozentual kleine Konzentrationsfehler aufgrund der katalytischen Eigenschaft der OxL sich stärker bemerkbar machen als die Schwankungsbreite der am Polarimeter gemessenen Drehwinkel und die Ungenauigkeiten der verwendeten Kolben, Spritzen und Pipetten. Nach Kap. 3.2.2.1/2 ~~des allgemeinen Teils kann~~ bei den berechneten Geschwindigkeiten mit einem Fehler von drei bis fünf v. H. gerechnet werden.

Die Grundlage für die mathematisch statistischen Berechnungen sind den Werken von Weber²³⁾ und Sachs²³⁾ entnommen. Für die Streuung des Mittelwertes (s_m) gilt:

$$s_m = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n \cdot (n - 1)}}.$$

Für den Regressionskoeffizienten, die Steigung einer Regressionslinie (b_{xy}), ist angeführt:

$$b_{xy} = \frac{\sum x_i \cdot y_i - \frac{\sum x_i \cdot \sum y_i}{n}}{\sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{n}}$$

Die Gleichung der Regressionslinie lautet:

$$Y = \bar{y} + b_{xy} \cdot (x_i - \bar{x}).$$

Umformen zu $Y = b_{xy} \cdot x_i - b_{xy} \cdot \bar{x} + \bar{y}$ verdeutlicht die Iden-

tität mit $y = a \cdot x + b$. Für die Standardabweichungen der y - Werte von der Regressionsgeraden gilt:

$$s_{yx} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{n - 2}},$$

$$\text{wobei } \sum (y_i - \bar{y})^2 = \sum (y_i - \bar{y})^2 - \frac{[\sum (x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})]^2}{\sum (x_i - \bar{x})^2}.$$

Die Gleichung für die Prüfung einer Hypothese über den Regressionskoeffizienten (Student'sches t , t_{H_0}) hat folgende Form:

$$t_{H_0} = \frac{|b_{xy}|}{s_{yx}} \cdot \sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2}.$$

Für das Bestimmtheitsmaß (B) und den Korrelationskoeffizienten wird angegeben:

$$B = r^2 = \frac{(b_{xy})^2 \cdot \frac{1}{n-1} \sum (x_i - \bar{x})^2}{\frac{1}{n-1} \sum (y_i - \bar{y})^2}$$

Die Werte für Mindestkorrelationen bei zutreffenden Freiheitsgraden sind Tabellen entnommen worden^{28,29}. Der Index i bezieht sich auf den 1. bis n -ten Wert. $\bar{x}$ und $\bar{y}$ ist das Mittel aller x_i 's und y_i 's.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- 1) Rosenthal, R.: Biochem. Z.: 14, 235 (1908)
- 2) Nordefeldt, E.: Biochem. Z.: 159, 1 (1925)
- 3) Albers, H., K. Hamann: Biochem. Z.: 255, 44 (1932)
269, 14 (1934)
Albers, H., K. Hamann, H. Albrecht: Biochem. Z.:
269, 26 (1934)
Albers, H., I. Meyer, K. Meyer: Biochem. Z.:
269, 35 (1934)
Albers, H., H. Albrecht: Biochem. Z.: 269, 43 (1934)
- 4) Becker, W., U. Benthin, E. Eschenhof, E. Pfeil:
Biochem. Z.: 337, 156 (1963)
Becker, W.: Dissertation Marburg, 1964
Becker, W., E. Pfeil: Biochem. Z.: 346, 301 (1966)
- 5) Eschenhof, E.: Dissertation Marburg, 1962
- 6) Seely, M. K., R. S. Criddle, E. E. Conn:
J. Biol. Chem.: 241, 4457 (1966)
- 7) Ultée, A. J.: Berichte: 39, 1956 (1906)
Rec. Trav. Chim. P. B.: 28; 1, 248, 249
(1909)
Wirth, P. H.: Arch. d. Pharm.: 249, 401 (1911)
Kiliani, H.: Berichte: 21, 916 (1882)
- 8) Lapworth, A.: J. Chem. Soc.: 83, 995 (1903)
85, 1206 (1904)
Lapworth, A., R. H. E. Manske: J. Chem. Soc.: 2533 (1928)
- 9) Swirbely, W. S., J. F. Roth: J. Am. Chem. Soc.:
75, 3106 (1953)
- 10) Hustedt, H. H.: Dissertation Marburg, 1957
Hustedt, H. H., E. Pfeil: Annalen: 640, 15 (1961)
- 11) Baker, J. W., M. L. Hemming: J. Chem. Soc.: 191 (1942)
Baker, J. W., H. B. Hopkins: J. Chem. Soc.: 1098 (1948)
- 12) Schoof, S.: Staatsexamensarbeit Marburg, 1972
- 13) Barrow, G. M.: Physikalische Chemie, Bd. III,
Braunschweig, Heidelberg, Wien, 1971
Moore, W. J., D. O. Hummel: Physikalische Chemie,
Berlin, New York, 1973
Rodebusch, W. H.: J. Am. Chem. Soc.: 45, 606 (1923)
J. Chem. Phys.: 4, 744 (1936)
La Mer, V. K.: J. Chem. Phys.: 1, 289 (1933)

- 14) Autorenkollektiv: Organikum, Berlin, 1967
- 15) Weast, R. C., et al.: Handbook of Chemistry und Physics, Cleveland, 1964
- 16) Prelog, V., M. Wilhelm: Helv. Chim. Acta: 37, 1634 (1954)
- 17) Mehner, K. H.: Staatsexamensarbeit Marburg, 1971
- 18) Gerstner, E.: Dissertation Marburg, 1970
Gerstner, E., E. Pfeil: Z. physiol. Chemie: 353, 271 (1972)
- 19) Aschoff, H-J.: Dissertation Marburg, 1968
Aschoff, H-J., E. Pfeil: Z. physiol. Chemie: 351, 818 (1970)
- 20) Haas, G.: Staatsexamensarbeit Marburg, 1971
- 21) Butenuth, J.: Dissertation Marburg, 1971
- 22) Dixon, M., E. C. Webb: Enzymes, London, Cholchester, 1967
- 23) Weber, E.: Grundriß der biologischen Statistik, Jena, 1964
Sachs, L.: Statistische Auswertungsmethoden, Berlin, Heidelberg, New York, 1969
- 24) Kuhn, W.: Ergeb. d. Enzymforschung: V, 1 (1936)
Angew. Chem.: 49, 215 (1936)
Zeit. Altersforschung: 1, 331 (1939)
- 25) Wiberg, E.: Die chemische Affinität, Berlin, New York, 1972
- 26) Wells, P. R.: Linear Free Energie Relationship, London, New York, 1968
Chapman, N. B.: Advances in Linear Free Energy Relationships, London, New York, 1972
- 27) Bernhard, S. A.: The Struktüre and Funktion of Enzymes, New York, Amsterdam, 1968
- 28) Jaffé, H. H.: Chem. Rev.: 53, 191 (1953)
- 29) Schwetlick, K.: Kinetische Methoden zur Untersuchung von Reaktionsmechanismen, Berlin, 1971
- 30) Staab, H. A.: Einführung in die theoretische organische Chemie, Weinheim, 1964
- 31) Pfeil, E.: persönliche Mitteilung
- 32) Cleland, W. W.: Biochim. Biophys. Acta: 67; 104, 173, 188 (1963)
The Enzymes, Vol. II, 1, New York, London, 1970
- 33) Monod, J., J. Wyman, J-P. Changeux: J. Mol. Biol.: 12, 88 (1965)
- 34) Koshland Jr., D. E., G. Némethy, D. Filmer: Biochemistry: 5, 365 (1965)

- 35) Slifkin, M. A.: Charge Transfer Interactions of Biomolecules, London, New York, 1971
- 36) Maurer, H. R.: Disc-Elektrophorese, Berlin, 1968
- 37) Bates, R. G., M. Paabo, R. A. Robinson:
J. phys. Chem.: 67, 1833 (1963)

A B K Ü R Z U N G S V E R Z E I C H N I S

1 Allgemeine Begriffe

α	= Drehwinkel in $^{\circ}/360$
a_m	= molekulare Aktivität, entspricht katalytischer Konstante
a_s	= spezifische Aktivität
a_k	= asymmetrische Konstante
u_{sl}	= unit
s_l	= Syntheseleistung
BA	= Benzaldehyd
R-BA	= substituierter BA
Cyhy	= symmetrisches Benzaldehydcyanhydrin
+Cyhy	= D-(+)-Benzaldehydcyanhydrin
D-Cyhy	= substituiertes D-(±)-Cyhy
OxL	= Mandel-hydroxynitrillyase

2 Kinetische Größen

$a_o, b_o, c_o, d_o, e_o, m_o, s_o$	= Anfangskonzentration des BA's, der HCN, des +Cyhy's, der OxL, eines Enzyms, eines Modifiers und eines Substrates
k	= Geschwindigkeitskonstante
t	= Zeit
v_o	= Geschwindigkeit zum Zeitpunkt $t = 0$
$K_A, K_B, \dots$	= Dissoziationskonstante eines Enzyms mit dem Substrat A, B, ...
K_{GL}	= Gleichgewichtskonstante
$K_{MA}, K_{MB}, \dots$	= Michaeliskonstante eines Enzyms mit dem Substrat A, B, ...
K_l, K_r, V_l, V_r	= Quasiparameter für K_M und V
V	= Maximalgeschwindigkeit bei infinitem s_o und definierten e_o

Andere als hier angeführte Kürzel sind unmittelbar im Text erklärt und werden nur begrenzt verwendet.

Meinem sehr verehrten Lehrer,

Herrn Professor Dr. Emanuel Pfeil,
danke ich aufrichtig für seine stets wohlwollende,
anregende und diskussionsfreudige Hilfe bei der
Erstellung dieser Arbeit.

L E B E N S L A U F

Am 14. Juni 1941 wurde ich als Sohn des Mühlenkaufmanns und Landwirts Josef Kisslinger und seiner Ehefrau Regina, geborene Kisslinger, in Breslau geboren.

Nach der Flucht durch die Tschechoslowakei und einem eineinhalbjährigen Aufenthalt in Österreich kamen wir nach Gladenbach, Kr. Biedenkopf.

Im April 1948 verstarb mein Vater in Marburg/Lahn.

Ich besuchte die Volks- und Mittelschule in Gladenbach und das Johanneum-Gymnasium in Herborn, Dillkreis. Dort legte ich im Februar 1962 die Reifeprüfung ab.

Zum Sommersemester 1962 wurde ich zum Studium der Chemie an der Philipps-Universität Marburg/Lahn zugelassen. Im November 1968 bestand ich die Diplomchemiker-Hauptprüfung und erhielt im April 1970 das Diplom.

Seit August 1971 bin ich mit der Studienrätin z. A. Heidi Kisslinger, geborene Gerlach, verheiratet. Wir haben zwei Söhne.

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Juni 1970 bis November 1973. Die wissenschaftliche Leitung hatte Herr Prof. Dr. E. Pfeil.

Meine akademischen Lehrer waren:

Bär, Balli, Butenuth, Dimroth, Dülfer, Follmann, Försterling, Gerstner, Gutman, Hampe, Hengge, Hensel, Kadenbach, Kamke, Karlson, Kaufmann, Kindel, Kirmse, Kuhn, Madelung, Mahr, Müller, Musso, Nöth, Pfeil, Pirson, Reigrotzki, Reinhardt, Schäfer, Schmid, Schmidbauer, Schmidt, Schneider, Schweig, Seelig, Senger, Stuke, Walcher, Witzel, Wöber, Wolf, Wurl.

